



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Efecto del agente sexador bovino para hembras sobre el porcentaje de producción de embriones hembras *in vitro***

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista

**Autora:**

Noelia Natalí López Zhindón

CI: 0301930723

**Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga, PhD

CI: 0102635463

**Cuenca - Ecuador**

04-junio-2019



## Resumen

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología. El objetivo fue determinar el efecto del agente sexador de semen (HeiferPlus™) sobre el porcentaje de embriones hembras obtenidos en producción in vitro (PIV). Se valoró calidad espermática, cantidad de ovocitos clivados y blastocistos obtenidos y número de embriones hembras y machos. Se analizó tres tiempos de co-incubación (semen + HeiferPlus™) y un control, utilizando un diseño completamente al azar, los resultados se evaluaron en SPSS® versión 25. Se comparó las variables cualitativas utilizando prueba de Chi cuadrado, para las cuantitativas se realizó un ANOVA y para comparar medias la prueba de Tukey al 5%. Los tratamientos T2 y T3 difieren de T1 y control en cuanto a Vitalidad y Motilidad Individual Progresiva; la Integridad de Membrana disminuyó en T1, T2 y T3 frente al control; las Anormalidades e Integridad de la Membrana Acrosomal no presentaron diferencia. El clivaje de T3 disminuyó respecto a T1 y T2, los cuales presentan valores menores que el control. El número de embriones fue similar T2, T3 y control, disminuyendo en T1. La relación de embriones hembras y machos no difieren estadísticamente aunque se encontró un incremento del 20,5% y 19,4% a favor de las hembras T1 y T2 frente al control. En conclusión HeiferPlus™ afecta parcialmente la calidad seminal, resultando un menor número de ovocitos clivados; sin embargo, no afecta el número de embriones obtenidos; empero, existe un incremento significativo no estadístico de embriones hembra en PIV al usar el agente sexador.

**Palabras claves:** HeiferPlus™. Semen sexado. PIV. Sexado de embriones



## Abstract

The research was conducted in the biotechnology laboratory. The objective was to determine the effect of the semen sexing agent (HeiferPlus™) on the percentage of female embryos obtained in vitro production (PIV). Sperm quality was assessed, number of cleaved oocytes and blastocysts obtained and number of embryos female and male. Three times of co-incubation (semen + HeiferPlus™) and one control were analyzed, using a completely randomized design, the results were evaluated in SPSS® version 25. The qualitative variables were compared using Chi-square test, for the quantitative ones performed an ANOVA and to compare means the Tukey test at 5%. Treatments T2 and T3 differ from T1 and control in terms of Vitality and Progressive Individual Motility; Membrane Integrity decreased in T1, T2 and T3 versus control; The Abnormalities and Integrity of the Acrosomal Membrane showed no difference. The cleavage of T3 decreased with respect to T1 and T2, which have lower values than the control. The number of embryos was similar T2, T3 and control, decreasing in T1. The ratio of female and male embryos do not differ statistically, although an increase of 20.5% and 19.4% was found in favor of the T1 and T2 females compared to the control. In conclusion HeiferPlus™ partially affects the seminal quality, resulting in a lower number of cleaved oocytes; however, it does not affect the number of embryos obtained; however, there is a significant non-statistical increase in female embryos in PIV when using the sexing agent.

**Keywords:** HeiferPlus™. Sexed semen. PIV. Embryo sexing



## Índice del Trabajo

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice del Trabajo.....	4
Índice de Figuras.....	6
Índice de Anexos.....	8
Abreviaturas y simbología.....	9
Cláusula de licencia y autorización para la publicación en el Repositorio Institucional .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Cláusula de Propiedad Intelectual .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
AGRADECIMIENTOS.....	13
DEDICATORIA.....	14
1 INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Objetivos.....	17
1.1.1 Objetivo general.....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
1.2 Hipótesis.....	17
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
2.1 Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV).....	18
2.1.1 Obtención de los complejos cúmulus-ovocito (COC's).....	18
2.1.2 Maduración de los ovocitos <i>in vitro</i> (MIV).....	21
2.1.3 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	22
2.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	27
2.2 Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV) con semen sexado.....	27



2.3	Agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™).....	29
2.4	Sexo de embriones.....	29
2.4.1	LAMP .....	30
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
3.1	Materiales .....	32
3.2	Métodos.....	34
3.2.1	Área de estudio .....	34
3.2.2	Metodología para la investigación experimental .....	35
3.3	Diseño experimental .....	42
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
4.1	Valoración seminal.....	45
4.2	Porcentaje de clivaje y embriones obtenidos.....	57
4.3	Relación hembras-machos.....	62
5	CONCLUSIONES.....	64
6	BIBLIOGRAFÍA .....	65
7	ANEXOS .....	80



## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Ovocitos categoría A - B - C - D (43).	21
<b>Figura 2:</b> Ovocito maduro, presenta el cúmulo totalmente expandido (49).	22
<b>Figura 3:</b> Tinción eosina-nigrosina. Espermatozoides muertos teñidos, espermatozoides vivos sin teñir (55).	24
<b>Figura 4:</b> Espermatozoide negativo al test de HOST (izq.), espermatozoide positivo al test de HOST (der.) (57).	25
<b>Figura 5:</b> Espermatozoide con acrosoma intacto (izq.). Espermatozoide con acrosoma dañado (der.) (1000x) (57).	26
<b>Figura 6:</b> Separación de espermatozoides mediante citometría de flujo (74).	28
<b>Figura 7:</b> Oligonucleótidos de LAMP. Primers internos (FIP, BIP), primers externos (F3, B3), primers lazo o bucle (LF, LB) (84).	31
<b>Figura 8:</b> Ubicación geográfica de la granja IRQUIS (87).	35
<b>Figura 9:</b> Esquema de PIV y LAMP	42
<b>Figura 10:</b> Porcentaje promedio de espermatozoides vivos (Vitalidad), luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (*=a●=ab■=b).	46
<b>Figura 11:</b> Porcentaje promedio de espermatozoides vivos (Vitalidad), luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (*=a●=ab■=b).	47
<b>Figura 12:</b> Motilidad individual progresiva (MIP), de los espermatozoides expresada en porcentaje, luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (*=a●=ab■=b).	49
<b>Figura 13:</b> Motilidad individual progresiva (MIP), de los espermatozoides expresada en porcentaje, luego del proceso de selección mediante las columnas de Percoll en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (*=a●=ab■=b).	49
<b>Figura 14:</b> Porcentaje de espermatozoides normales luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. *=indica diferencia entre grupos.	51
<b>Figura 15:</b> Porcentaje promedio de espermatozoides normales, luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. *=indica diferencia entre grupos.	52
<b>Figura 16:</b> Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivamente a la prueba de Host, luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. *=indica diferencia entre grupos.	53



**Figura 17:** Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivamente a la prueba de Host, luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=indica diferencia entre grupos. .... 54

**Figura 18:** Porcentaje de espermatozoides con membrana acrosomal íntegra, luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=indica diferencia entre grupos. .... 56

**Figura 19:** Porcentaje de espermatozoides con membrana acrosomal íntegra, luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=indica diferencia entre grupos..... 56

**Figura 20:** Porcentaje promedio de clivaje, en cada uno de los tratamientos T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a•=b■=c). .... 57

**Figura 21:** Porcentaje promedio de embriones, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a°=ab■=b).. 59

**Figura 22:** Porcentaje de cada estadio de desarrollo de los embriones (M=mórula; BT=Blastocisto temprano; B=Blastocisto; BE=Blastocisto expandido; BP=Blastocisto protruido), en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a°=ab■=b). .... 61

**Figura 23:** Porcentaje de embriones hembras y machos obtenidos en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a°=ab■=b). .... 63



## Índice de Anexos

<b>Anexo 1:</b> Materiales y equipos empleados.....	80
<b>Anexo 2:</b> Agente sexador de semen (HeiferPlus™) .....	82
<b>Anexo 3:</b> Procedimiento en el laboratorio .....	85





## Abreviaturas y simbología

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**CIV:** Cultivo *in vitro*

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**COC's:** Complejos cúmulus-ovocito

**DCA:** Diseño completamente al azar

**FIV:** Fecundación *in vitro*

**FSH:** Hormona foliculoestimulante

**Ha:** Hectáreas

**HOST:** Hypoosmotic Swelling Test

**IA:** Inseminación artificial

**km:** Kilómetros

**LAMP:** Amplificación isotérmica mediada por un lazo

**LH:** Hormona Luteinizante

**min:** Minutos

**MIP:** Motilidad individual progresiva

**MIV:** Maduración *in vitro*

**ml:** Mililitros

**mg:** Miligramos

**mm:** Milímetros

**mmHg:** Milímetros de mercurio

**mM:** Milimolar

**msnm:** Metros sobre el nivel del mar

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno



**ng:** Nanogramos

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**OPU:** Ovum pick-up

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PIV:** Producción de embriones *in vitro*

**RA:** Reacción acrosomal

**SOF:** Fluido oviductal sintético

**UI:** Unidades internacionales

**µg:** Microgramos

**µl:** Microlitros

**µM:** Micromolar

**g:** Gravedad



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Noelia Natalí López Zhindón en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Efecto del agente sexador bovino para hembras sobre el porcentaje de producción de embriones hembras *in vitro*”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de junio de 2019

Noelia Natalí López Zhindón

C.I: 0301930723



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Noelia Natalí López Zhindón, autora del trabajo de titulación “Efecto del agente sexador bovino para hembras sobre el porcentaje de producción de embriones hembras *in vitro*”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 04 de junio de 2019

Noelia Natalí López Zhindón

C.I: 0301930723



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi madre por ser mi ejemplo, por darme la fuerza y el apoyo para alcanzar todas mis metas y por enseñarme que los sueños se pueden cumplir con trabajo y dedicación.

A los doctores Daniel Argudo, Antonio Vallecillo, Jhonatan Alvarado, Luis Galarza, Manuel Soria, Rafael Ochoa y Juan Alvarado por su colaboración para la realización de este proyecto.

De manera especial a mi director de tesis Dr. Luis Ayala por brindarme su apoyo total, por sus ideas y por guiarme de la mejor manera en la elaboración de este trabajo.

Y a todos quienes de una u otra manera me brindaron su ayuda para cumplir este sueño.

**Noelia López Zhindón**



## DEDICATORIA

Con todo el amor le dedico este logro a mi madre Norma por su amor, su sacrificio, su ejemplo y por el apoyo que me ha brindado en todos los aspectos de mi vida más aun en mi formación profesional.

A mi tía Aida y mi prima Paola que se convirtieron en mi segunda madre y hermana y me motivan para superarme y cada día a ser mejor.

A Jimmy por brindarme el cariño de un padre y por su apoyo en todo momento.

A Diego quien con su amor me ha dado el aliento para continuar en los momentos difíciles y me ha enseñado que con dedicación todo es posible.

**Noelia López Zhindón**



## 1 INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos se ha buscado mejorar el rendimiento de las ganaderías bovinas, mediante la implementación de varias biotecnologías, como la producción de embriones *in vitro* (PIV). Este proceso se realiza a partir de ovocitos obtenidos de ovarios de vacas de matadero o animales vivos, los cuales son madurados, fecundados y cultivados en laboratorio (1). La PIV conjuntamente con otras biotecnologías tiene como finalidad aprovechar al máximo el material genético, que permita obtener un mayor número de nacimientos por vaca al año (2); sin embargo, luego de los 6 o 7 días del proceso de PIV apenas un 25-40% de ovocitos alcanzan el estadio de blastocisto (3); además, estos embriones son de menor calidad si los comparamos con los producidos *in vivo* obteniendo porcentajes de gestación bajos que fluctúan entre el 30-40% (4).

Generalmente en la PIV, los ovocitos son fecundadas con semen convencional (no sexado), llegando a producir alrededor de un 25-40% de blastocistos viables, estos embriones mantienen la relación del sexo en un 50% hembras y 50% machos como sucede *in vivo*, no obstante en la actualidad se busca incrementar el porcentaje de embriones de un sexo determinado dependiendo la actividad de la explotación (leche-hembras; carne-machos), con el fin de mejorar la rentabilidad (5) y se ha demostrado que con el uso de semen sexado se puede alcanzar hasta un 90% de crías del sexo deseado (6).

El sexaje de semen se realiza por una técnica llamada citometría de flujo (7), que utiliza una tinción fluorescente, misma que se une al ADN de las gametas. Para entender este proceso se debe tener en cuenta que los espermatozoides X contienen un 3.8% más ADN que los espermatozoides Y; por lo tanto, captan más tinción y emiten más fluorescencia (8), el citómetro de flujo detecta la diferencia de fluorescencia y los separa en tres grupos: el primero con mayor luminosidad (espermatozoides X), segundo con menor luminosidad (Y) y los muertos o que no han podido ser clasificados en el tercer grupo (9). Todo este proceso es largo, lo cual reduce la cantidad de espermatozoides disponibles y por ende encarece la producción comercial. A tal punto de que las pajuelas de semen sexado



contienen apenas 2 millones de espermatozoides, es decir 10 veces menos cantidad que una pajuela convencional (20 millones). Además, estos espermatozoides al haber sufrido gran manipulación en su proceso de sexaje, se encuentran pre capacitados, lo cual disminuye su capacidad de fecundación in vivo (10). Sin embargo, en la producción de embriones in vitro (PIV) la cantidad de espermatozoides necesarios para la fecundación es menor. Además, en la fecundación in vitro (FIV), los espermatozoides a utilizar deben estar pre capacitados; por lo tanto, es un punto a favor del semen sexado (11,12).

Lamentablemente, los resultados obtenidos con el uso de semen sexado en la PIV son desalentadores, pues la tasa de fecundación in vitro se reduce en un 10 a 20% (13). Esto conlleva a tener un menor número de blastocistos transferibles al final del proceso (5,14), con alteraciones ultraestructurales, en su morfología y metabolismo, lo cual disminuye su capacidad para lograr una gestación (15,16). Estas implicaciones han generado que el uso de semen sexado comercial en la producción de embriones in vitro se vea limitada.

Estudios recientes vienen trabajando en diversas alternativas baratas, eficaces y eficientes, que permitan obtener embriones del sexo requerido tanto in vivo como in vitro. Una de ellas es el uso de un agente sexador de semen bovino de uso comerciales (HeiferPlus™, EMLAB Genetics, USA). Según la información del fabricante este producto mezclado con el semen convencional, incubado por 20 minutos y luego utilizado para la fecundación vía inseminación artificial (in vivo) o en fecundación in vitro (FIV), permitiría obtener mayor número de crías hembras sin afectar la tasa de concepción, esto basado en el principio de que aceleraría la motilidad de los espermatozoides X y disminuiría en el espermatozoide Y (17,18). Sin embargo, la información existente es muy limitada sobre cómo actúa este agente sexador y si realmente incrementa el porcentaje de embriones hembras obtenidos en un proceso de PIV.





## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo general

Determinar el efecto del agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™) sobre el porcentaje de embriones hembras obtenidos en un proceso de producción de embriones in vitro (PIV).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Valorar la calidad espermática pos-incubación con el agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™) en los cuatro tratamientos en estudio.
- Determinar el porcentaje de clivaje y embriones obtenidos en los tratamientos a realizarse.
- Establecer si la co-incubación con el agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™) del semen utilizado en el proceso de fecundación in vitro (FIV) permite obtener mayor número de embriones hembra.

## 1.2 Hipótesis

La co-incubación del semen con agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™) previo a la fecundación in vitro (FIV) permite obtener mayor porcentaje de embriones hembra.



## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Producción in vitro de embriones (PIV)

La producción de embriones in vitro (PIV) es una de las biotecnologías ampliamente usadas en las últimas décadas, reproduce de manera artificial los procesos de maduración y fecundación ovocitaria (19). Son varias las ventajas que nos brinda ya que permite preservar la genética de animales que han sido sacrificados, un mejor uso del semen de alto valor genético, control de enfermedades reproductivas, entre otras (1). Sin embargo, existen desventajas entre las cuales podemos mencionar un bajo porcentaje de embriones transferibles (30–40%), menor calidad, bajos porcentajes de gestación, problemas en las criopreservación (20).

La PIV se realiza en varias etapas; la primera es la obtención de los complejos cúmulus-ovocito COC's, ya sea de animales de matadero o de hembras vivas (21), la segunda etapa es la maduración de los ovocitos, en la cual ocurren una serie de cambios en su citoplasma y núcleo, la tercera etapa es la fecundación que es la interacción de los gametos femeninos y masculinos y la cuarta etapa es el cultivo en la que se obtienen los blastocistos (22).

#### 2.1.1 Obtención de los complejos cúmulus-ovocito (COC's)

Los ovarios contienen un gran número de folículos en diferentes estados de desarrollo, la recolección de ovocitos permite aprovechar los folículos no ovulatorios que en condiciones fisiológicas se volverían atrésicos (23). Los complejos cúmulus-ovocito (COC's) pueden ser obtenidos tanto de animales vivos como de ovarios provenientes de vacas sacrificadas en el matadero (24).

##### 2.1.1.1 Obtención de COC's de animales vivos

La obtención de ovocitos de animales vivos permite obtener mayor número de embriones y/o terneros por donadora al año (25). Los ovocitos pueden ser recuperados de hembras de todas las edades, en animales cíclicos o acíclicos, en el primer tercio de gestación y animales que no respondan a la



estimulación hormonal. El método más empleado es la aspiración guiada por ultrasonografía (OPU, Ovum Pick-Up) (26,27).

### **Ovum pick-up (OPU)**

El método de aspiración folicular transvaginal (OPU), fue usado por primera vez en ganado vacuno en Holanda al final de la década de los 80 y hasta la fecha han nacido más de 200 000 terneros usando dicha tecnología (28). OPU permite recuperar ovocitos de animales vivos, es decir, se conoce el origen del material genético, por lo tanto es una buena alternativa de mejoramiento del hato obteniendo mayor número de embriones por vaca al año (29), además puede ser aplicada en animales de alto valor genético que han desarrollado problemas reproductivos, animales jóvenes, gestantes o seniles (30). Se considera una técnica poco invasiva lo que permite repetirla con frecuencia en un mismo animal (31), para su realización se emplea un ecógrafo el cual nos ayuda a visualizar los folículos que serán puncionados con una aguja acoplada a una sonda transvaginal (24). Factores técnicos como tamaño de aguja y presión de vacío influyen sobre la calidad de ovocitos recuperados, además de los factores biológicos incluyendo el animal, tratamientos hormonales, frecuencia de OPU y la experiencia del operador (32,33).

#### **2.1.1.2 Obtención de COC's post mortem**

El uso de ovarios provenientes de hembras enviadas a matadero es una alternativa para el desarrollo de las biotecnologías de la reproducción ya que constituyen una fuente de ovocitos a bajo costo (24), en grandes cantidades y de buena calidad (27). La recuperación de COC's post mortem se puede realizar por punción folicular y seccionamiento de los ovarios (34).

### **Punción folicular**

La punción o aspiración folicular es el método más usado para la investigación, consiste en aspirar el líquido de los folículos de la superficie de los ovarios mediante una aguja ya sea con una jeringa o con



una bomba de vacío (35), se puncionarán los folículos <8 mm ya que estos proporcionan ovocitos de mejor calidad (36). Es un método rápido lo que implica que los ovocitos están expuestos por menos tiempo a condiciones extrafoliculares (37), aunque es importante tomar en cuenta el calibre de la aguja el cual es determinante en cuanto a la calidad de los ovocitos, agujas de calibre pequeño dañan la integridad de los ovocitos (38), de la misma forma al usar la bomba de vacío se recomienda presiones  $\leq 65$  mmHg con el fin de no afectar la calidad de los ovocitos (39).

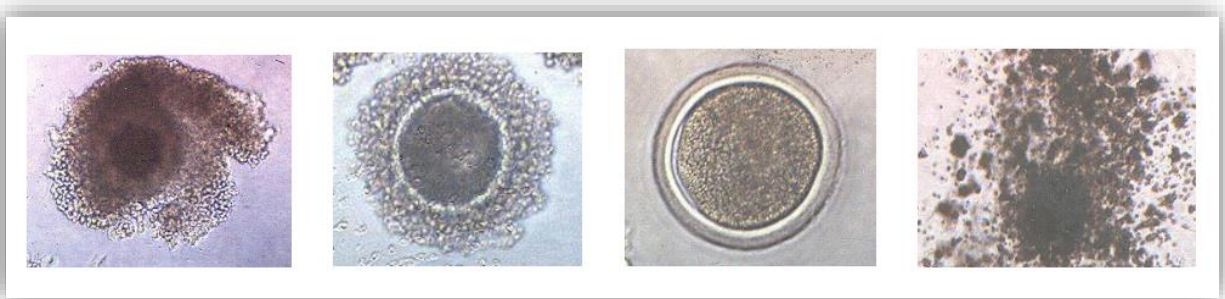
### **Seccionamiento ovárico (Slicing)**

Los ovarios son colocados en cajas Petri con medio de colección y con un bisturí se realizan cortes transversales y longitudinales en la superficie e interior de los mismos (24). Se ha demostrado que mediante este método se recuperan mayor cantidad de ovocitos en comparación con la punción folicular, sin embargo la calidad es menor (40,41).

Una vez obtenidos los COC's se evalúan y clasifican morfológicamente con el fin de tener resultados favorables en la posterior maduración y fecundación, dicha clasificación se basa en la apreciación visual, considerando las características del cúmulus y del citoplasma del ovocito (27).

Se clasifican en cuatro categorías:

- A: ovocito con apariencia compacta, más de cuatro capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo y transparente.
- B: con 1 a 3 capas de células del cúmulus, con citoplasma parcial o totalmente homogéneo con algunas zonas oscuras.
- C: ovocitos totalmente denudados, citoplasma con zonas oscuras irregulares.
- D: ovocitos deformados con cúmulus expandido y descolorido (24,42).



**Figura 1:** Ovocitos categoría A - B - C - D (43).

Solamente los ovocitos de categoría A y B se usarán para la producción de embriones *in vitro* (44).

### 2.1.2 Maduración de los ovocitos *in vitro* (MIV)

El objetivo de la maduración ovocitaria es producir un ovocito secundario haploide que cuente con el potencial biológico para continuar su desarrollo (45), en esta etapa se reactiva la meiosis hasta alcanzar la metafase II y adquiere la capacidad para ser fecundado y desarrollarse hasta blastocisto (46), *in vivo* la meiosis se reinicia gracias al pico preovulatorio de LH, mientras tanto *in vitro* dicho reinicio se da de forma espontánea al retirar el ovocito del folículo (35).

La maduración consiste en varios eventos que implican la maduración citoplasmática y maduración nuclear. Dentro de la maduración citoplasmática tenemos cambios de morfología y la redistribución de los orgánulos que ocurren gracias a la dinámica de los filamentos del citoesqueleto que se adaptan a las necesidades de la célula, además se da una reprogramación de la síntesis proteica donde los ARNm comienzan a transcribirse y se traducen en proteínas necesarias para la maduración y procesos celulares posteriores (47). En el núcleo se presenta la condensación de la cromatina y la disolución de la membrana nuclear (46), lo que se conoce como rotura de la vesícula germinal, continúa con la extrusión del primer corpúsculo polar y los cromosomas presentan la configuración de metafase II (48).



**Figura 2:** Ovocito maduro, presenta el cúmulo totalmente expandido (49).

Para la maduración *in vitro* existen diferentes medios como el TCM-199 suplementado con una mezcla de hormonas, antioxidantes, factores de crecimiento y macromoléculas, además se debe proporcionar condiciones ambientales adecuadas, una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 38,5°C y humedad de saturación (38).

### 2.1.3 Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación *in vitro* (FIV) es el proceso en el cual los ovocitos maduros se cultivan junto con los espermatozoides con el objetivo de la fusión de las gametas (50). La fecundación *in vivo* inicia con la capacitación espermática, es decir, los espermatozoides adquieren su capacidad para poder fecundar el ovocito, dicho proceso ocurre en el aparato reproductor de la hembra; una vez que los espermatozoides fecunden al ovocito maduro, se completa la meiosis II (21).

El proceso de capacitación *in vitro* tiene como finalidad la eliminación los componentes adheridos a la membrana de espermatozoide, producir cambios en la composición lipídica de la membrana, aumentar la permeabilidad de calcio, entre otros cambios fisiológicos (46). Existen diferentes técnicas para la



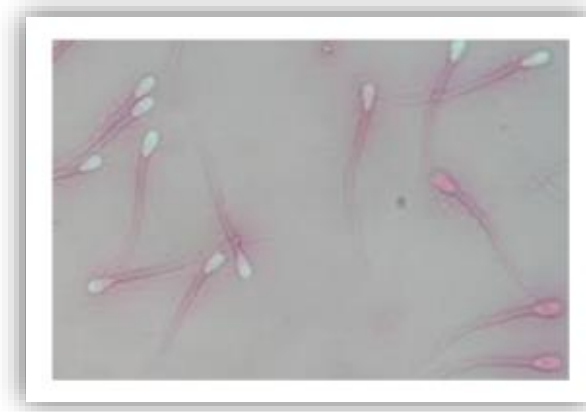
capacitación espermática entre las que encontramos el uso de soluciones hipertónicas, cafeína, heparina, gradientes de Percoll, etc., (50).

### **2.1.3.1 Calidad espermática**

Es importante tener en cuenta la calidad del semen que se usará en la PIV ya que de ella depende mucho el resultado final. Al valorar una muestra de semen se evalúan factores como el número de espermatozoides viables, su morfología y fisiología lo que indica que los espermatozoides son capaces de llevar a cabo la fecundación del ovocito (51).

#### **Vitalidad**

La calidad seminal se ve reflejada en la cantidad de espermatozoides vivos que presenta la muestra por ello es importante evaluar la vitalidad espermática, para lo cual se usan colorantes vitales, el más usado es eosina-nigrosina por su facilidad y utilidad (52). Para la prueba se mezcla una gota de semen con una gota del colorante y se realiza un extendido, al microscopio se observan los espermatozoides muertos teñidos de color rojo o rosa, mientras que los vivos permanecen sin teñir (53), esto debido a que el colorante es capaz de atravesar la membrana celular que presenta daño como es el caso de los espermatozoides muertos, mientras que la membrana de los espermatozoides vivos se encuentra intacta y no permite el paso de la tinción (54).



**Figura 3:** Tinción eosina-nigrosina. Espermatozoides muertos teñidos, espermatozoides vivos sin teñir (55).

### **Motilidad espermática**

La motilidad espermática es uno de los aspectos que se valoran con el fin de evaluar la calidad seminal. Es importante que los espermatozoides presenten un movimiento activo ya que ello permitirá su desplazamiento en el tracto reproductor de la hembra y que se produzca la fecundación (56). Al momento de su evaluación se observa el porcentaje de espermatozoides móviles y el tipo de movimiento que presentan (57); a pesar de que en la actualidad existen sistemas automáticos de medición, dicha evaluación también se puede realizar de forma subjetiva mediante la observación visual de una muestra de semen con un microscopio, sin embargo la exactitud y precisión dependerán del observador (51).

### **Anormalidades espermáticas**

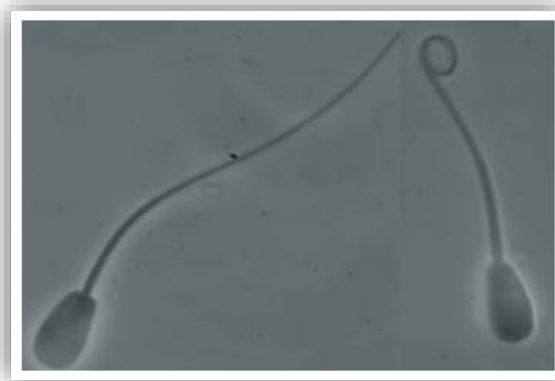
La morfología de los espermatozoides es uno de los aspectos más importantes dentro de la evaluación seminal ya que ésta influye sobre la fertilidad de una muestra seminal (58), puesto que cualquier malformación puede afectar la capacidad de los espermatozoides para desplazarse dentro del tracto



genital de la hembra lo que implica que no se presente la unión con el ovocito (59). Las anomalías espermáticas pueden distinguirse mediante el test con eosina-nigrosina (60), considerando que una muestra seminal debe contener como mínimo un 70% de espermatozoides normales para ser congelado (53,56).

### **HOST (Hypoosmotic Swelling Test)**

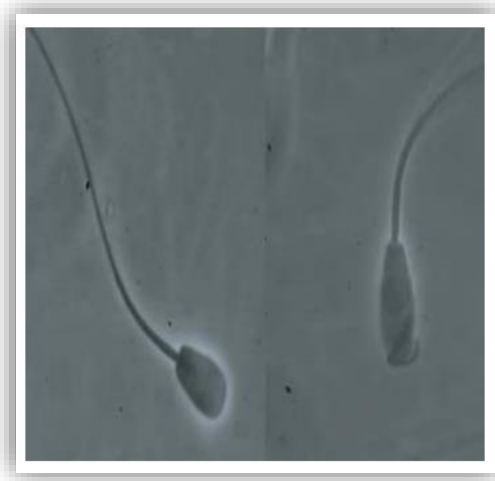
La viabilidad y la capacidad de fecundación de los espermatozoides dependen en gran medida de la estructura y funcionalidad de la membrana espermática (61); la capacitación espermática, la reacción acrosomal y la unión del espermatozoide con el ovocito se dan gracias a una membrana espermática intacta (62). HOST permite evaluar el estado funcional de la membrana espermática (63), se basa en la permeabilidad de la membrana ya que al estar intacta y expuesta a una solución hipoosmótica, absorbe agua lo que causa cambios morfológicos de los espermatozoides (64), la célula trata de mantener el equilibrio intra y extra celular lo que causa que se hinchen, iniciando por la cola, es decir, los espermatozoides con membrana celular intacta presentan la cola curvada mientras que aquellos que presenten defectos en la membrana no lo hacen (65,66).



**Figura 4:** Espermatozoide negativo al test de HOST (izq.), espermatozoide positivo al test de HOST (der.) (57).

### Integridad de la membrana acrosomal

El acrosoma es parte fundamental del proceso de fecundación puesto que solamente los espermatozoides capaces de realizar la reacción acrosomal (RA) en el momento de la penetración del oocito, tienen la capacidad de atravesar la zona pelúcida y producir la fecundación (67), sin embargo procesos como la congelación y descongelación del semen pueden afectar dicha membrana y por lo tanto la capacidad fecundante de los espermatozoides (68). Existen varios métodos para determinar el estado del acrosoma como tinciones, inmunofluorecencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales, el marcaje con lectinas fluoresceinadas (69) y en el caso de espermatozoides bovinos debido a su tamaño se puede valorar mediante microscopía de contraste de fases donde se observa la descondensación parcial de la cabeza (57).



**Figura 5:** Espermatozoide con acrosoma intacto (izq.). Espermatozoide con acrosoma dañado (der.) (1000x) (57).



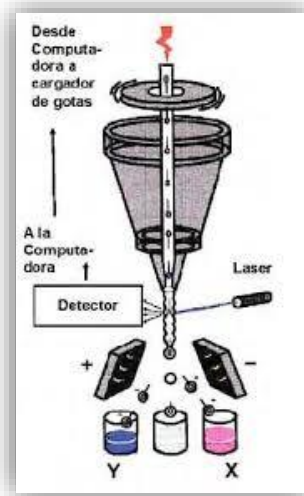
#### **2.1.4 Cultivo *in vitro* (CIV)**

El cultivo de embriones *in vitro* es el último proceso de la PIV, después de la fecundación, los embriones son transferidos a un nuevo medio donde permanecen 7 días, de manera que continúen con su división celular a 8, 16 y 32 células, llegando a mórulas y blastocistos respectivamente (20). Los embriones se cultivan en el medio SOF (fluido oviductal sintético) suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales con el fin de satisfacer las necesidades nutricionales de los embriones (4), las condiciones para el desarrollo embrionario son diferentes a las usadas para MIV y FIV siendo necesaria una atmósfera con el 5% de O<sub>2</sub> (24).

En el proceso de PIV, aproximadamente el 90% de los ovocitos llegan a madurar, de estos el 80% son fecundados y comienzan el proceso de división celular, a pesar de ello solo el 25-40% alcanzan el estadio de blastocisto, por lo tanto el CIV es el que determina la eficiencia de todo el proceso y la calidad de embriones obtenidos (20).

#### **2.2 Producción *in vitro* de embriones (PIV) con semen sexado**

Los avances en la biotecnología reproductiva han incrementado la eficiencia de la industria lechera, entre ellas el sexado de espermatozoides, ya que predecir el sexo de las futuras crías representa un progreso significativo en la producción lechera (70), aquí existe la necesidad de aumentar la cantidad de nacimientos de hembras (71) con el fin de mantener la reposición del hato; es decir, las crías hembras reemplazarán a las hembras de descarte y las muertas (72). La citometría de flujo es la técnica más usada para el sexado de semen ya que permite separar a los espermatozoides dependiendo de sus cromosomas sexuales, se basa en la cantidad de ADN que contienen los espermatozoides (5), separa los espermatozoides X e Y ya que el cromosoma X contiene un 3,8% más de ADN que el Y (72), sin embargo dicho proceso puede causar efectos adversos sobre los espermatozoides afectando su motilidad, viabilidad y la integridad de la membrana (73).



**Figura 6:** Separación de espermatozoides mediante citometría de flujo (74).

El porcentaje de crías machos en la PIV usando semen convencional es aproximadamente un 54% (75), por lo tanto la combinación de PIV y semen sexado nos ayudan a aumentar la probabilidad de obtener crías del sexo deseado, además en la PIV se requiere una menor cantidad de semen por lo tanto se optimiza el uso del semen de alto valor genético (11), a pesar de ello, existe contradicciones en los resultados en cuanto a la tasa de fecundación, unos estudios demuestran que los resultados son similares usando semen sexado y semen convencional, pero otros señalan que el uso de semen sexado disminuye el porcentaje fecundación (73), estudios como el de Oses *et al.*, (5) demuestran que el porcentaje de blastocistos obtenidos con semen sexado resultó inferior al obtenido con semen convencional, de igual manera Larocca *et al.*, (70) encontraron diferencia en el desarrollo embrionario a favor del semen convencional en su experimento, a pesar de ello en el mismo estudio no se encontró diferencia entre semen sexado y no sexado usando un toro diferente.



### **2.3 Agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™)**

En la actualidad el uso de semen sexado en procesos de PIV presenta dificultades, las más destacadas son que aumenta el costo de producción y además disminuye el porcentaje de blastocistos viables, lo cual puede deberse a que durante su producción (citometría de flujo) los espermatozoides se someten a procesos que pueden afectar su capacidad fecundante (10), en consecuencia se ha visto necesario buscar diferentes tecnologías para sexado de semen, entre ellas destaca un agente sexador de semen bovino (HeiferPlus™), un producto creado por Timothy J. Williams (EMLAB Genetics), HeiferPlus™ es un agente para sexar semen de toro, su propósito es aumentar el porcentaje de crías hembras en rebaños lecheros (18).

El proceso de sexado se da gracias a que el agente sexador de semen bovino (HeiferPlus™), mediante un proceso enzimático estimula o acelera la fertilidad y motilidad del espermatozoide que contiene el cromosoma X y por otro lado disminuye la motilidad del espermatozoide portador del cromosoma Y (6), por lo tanto los ovocitos serán fecundados con los espermatozoides que portan el cromosoma X dando como resultado un incremento de al menos un 20% en el porcentaje de terneras nacidas, además la compañía asegura que no existen efectos negativos en cuanto a tasas de concepción, incluso informan de un aumento del 5-25% (76).

### **2.4 Sexo de embriones**

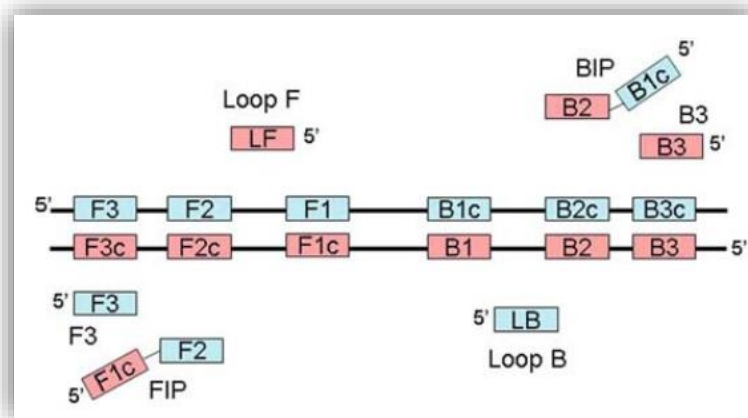
La determinación del sexo se da por la combinación de los cromosomas sexuales en el genoma de los animales (77), en el eyaculado existen espermatozoides que contienen el cromosoma X y otros que contienen el cromosoma Y, mientras que los oocitos solo contienen el cromosoma X, por lo tanto en el momento de la fecundación, el espermatozoide que posee el cromosoma X dará origen a un individuo de sexo femenino (XX) y el espermatozoide que posee el cromosoma Y origina un individuo de sexo masculino (XY) (46,78).



La necesidad de predecir el sexo de la crías basa su importancia en los múltiples beneficios que conlleva como por ejemplo el valor económico para diferentes sexos dependiendo de la raza del ganado, reposición del hato, prevención de enfermedades, entre otros; por lo tanto, la manipulación de embriones producidos *in vitro* se ha vuelto una alternativa para alterar la proporción de sexos de la descendencia, para ello existen diferentes métodos que básicamente los podemos clasificar en dos: invasivos (análisis citogenético, hibridación con sondas de ADN específicas para el cromosoma Y, además la reacción en cadena de la polimerasa) y no invasivos (determinación de enzimas ligadas al cromosoma X, la utilización del antígeno H-Y y la diferencia de desarrollo entre embriones machos y hembras), considerando que los últimos mantienen la integridad embrionaria por lo tanto permiten el posterior desarrollo embrionario, sin embargo su precisión no se iguala con los métodos invasivos (79–81).

#### **2.4.1 LAMP**

La amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP), un nuevo método para el sexado de embriones, fue descrito por primera vez por Notomi *et al.*, en el año 2000; esta técnica amplifica una secuencia de ADN con alta especificidad y eficiencia, se realiza bajo condiciones isotérmicas (60–65°C) en un tiempo relativamente corto (30 min – 1h) (82). LAMP se basa en el autociclo de desplazamiento de cadena de síntesis de ADN para ello emplea una ADN polimerasa y un conjunto de cuatro primers u oligonucleótidos específicos: dos primers internos (FIP, BIP) y dos externos (F3, B3) que reconocen seis secuencias distintas en el ADN, además de un conjunto de oligonucleótidos adicionales, primers lazo (LF, LB) para acelerar la reacción (83,84).



**Figura 7:** Oligonucleótidos de LAMP. Primers internos (FIP, BIP), primers externos (F3, B3), primers lazo o bucle (LF, LB) (84).

El resultado de la amplificación es una estructura de múltiples lazos con tallos sobre el ADN diana, lo que da un aspecto parecido a una coliflor (85). La amplificación se puede realizar en un baño maría o en bloques de calentamiento y la reacción puede observarse midiendo la turbidez de la solución, ya que produce un precipitado blanco de pirofosfato de magnesio cuando la secuencia diana se amplía con éxito, sin embargo se pueden usar otros métodos de detección tal es el caso de la adición de colorantes que facilitan la visualización del resultado (83).

El sexado de embriones se realiza utilizando dos reacciones LAMP, una reacción específica para macho y una reacción común (bovino), cuando ambas reacciones son positivas, se considera que el sexo de los embriones es masculino, por otro lado, cuando solo la reacción común es positiva, se considera que el sexo de los embriones es femenino (86).



### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

- **Físicos**

- Cooler
- Tijeras
- Papel secante
- Agujas
- Placa de calentamiento
- Jeringas de dos piezas
- Tubos Falcon de 15 ml
- Micropipetas
- Cajas Petri
- Estereoscopio
- Estufa
- Cámara trigas
- Cámara de flujo laminar
- Tubos eppendorf
- Vórtex
- Centrífuga
- Cámara de Neubauer
- Baño María
- Cronómetro
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio





- Termociclador
- Vasos de precipitación
- Marcadores
- Probeta
- Matraz de Erlenmeyer
- Balanza analítica
- Horno de microondas
- Bandeja para gel de electroforesis
- Peinillas para formar pocillos
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- **Biológicos**
  - Ovocitos
  - Semen
- **Químicos**
  - Etanol 70%
  - Solución salina 0,9%
  - Aceite mineral
  - Eosina-nigrosina
  - Solución de Host
  - Agua grado biología molecular
  - Medio de maduración
  - Medio de fecundación
  - Medio de cultivo
  - Percoll
  - Medio FIV-SOF

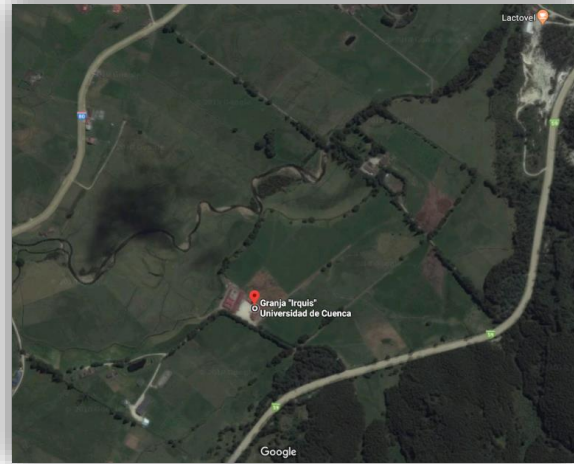


- HeiferPlus™ (Agente sexador de semen)
- Solución de Oligonucleótidos o primers 100 mM
- Bsm ADN polimerasa
- Agarosa
- Buffer TAE
- Bromuro de Etidio
- Buffer de carga para ADN
- Marcador de peso molecular

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Área de estudio**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en la Granja IRQUIS, el cual se encuentra en el km 23 de la vía Cuenca– Girón, parroquia Victoria del Portete, altura 2663 msnm., la granja tiene aproximadamente 507,8 Ha., y un clima templado frío con una temperatura promedio de 8°C. Los habitantes de esta zona, en su mayoría, se dedican a la producción ganadera.



**Figura 8:** Ubicación geográfica de la granja IRQUIS (87).

### **3.2.2 Metodología para la investigación experimental**

#### **3.2.2.1 Colecta de ovarios, punción folicular y obtención de COC's**

Se colectaron ovarios bovinos del camal municipal de Cuenca (EMURLAG EP), los mismos que fueron transportados en un termo con solución salina (0,9%), temperatura entre 25-35°C para su procesamiento en el laboratorio. Una vez en el laboratorio se retiraron cuidadosamente los tejidos adyacentes a los ovarios y se lavaron tres veces en solución fisiológica estéril atemperada (35-37°C). Previo a la punción folicular los ovarios se empaparon con alcohol para bajar la carga bacteriana. Luego se tomó cada ovario y se puncionaron los folículos con un diámetro entre 2 a 8 mm, usando una jeringa de dos piezas y una aguja calibre 21G. El líquido folicular recuperado se colocó en un tubo Falcon de 15 ml atemperado (35-37°C), donde se dejó decantar durante 15 minutos, transcurrido este tiempo con una pipeta se aspiró el pellet del fondo del tubo el cual se colocó en una placa Petri de búsqueda.



La placa con líquido folicular se llevó a un estereoscopio para realizar la búsqueda y selección de COC's, los cuales se clasificaron de acuerdo al criterio descrito por Samaniego *et al.*, (42) en aptos categorías (A, B) y no aptos (C y D):

- A = ovocito de apariencia compacta, con más de 4 capas de células del cúmulus, citoplasma granular uniforme y transparente;
- B = ovocito con 1 a 3 capas de células del cúmulus que cubren la zona pelúcida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granulado;
- C = ovocitos totalmente desnudos, y/o citoplasma con zonas oscuras irregulares;
- D = ovocitos deformados con células de la granulosa que cubren parcial o totalmente la zona pelúcida o completamente expandidos con cúmulus disperso y descolorido.

Se usaron únicamente los COC's seleccionados como aptos y se lavaron en tres gotas de medio Hapes-Fluido Oviductual Sintético (H-SOF).

Se repitieron las maniobras de colecta de ovarios y punción folicular hasta completar 200 COC's aptos por tratamiento.

### **3.2.2.2 Maduración *in vitro* (MIV)**

El medio de maduración estuvo constituido por: TCM 199 suplementado con 0,1 mg/ml de L-glutamina, 2,2 mg/ml de bicarbonato, 10 % de Suero fetal bovino, 100  $\mu$ M de Cisteamina, 50  $\mu$ g/ml de Gentamicina, 0,01 UI de FSH y 10 ng/ml de EGF; una vez preparado el medio de maduración fue estabilizado dos horas antes de iniciar la MIV. La maduración se realizó en microgotas, para esto se usaron placas Petri, sobre las cuales se colocaron gotas de 90  $\mu$ l de medio de maduración y fueron cubiertas con aceite mineral. Luego se colocó los ovocitos en las gotas e inmediatamente se los llevó a incubación en la estufa con 5% de CO<sub>2</sub>, humedad 90% y 38,5 °C de temperatura.



### 3.2.2.3 Fecundación *in vitro* (FIV)

Pasadas 22-24 horas desde la punción folicular se continuó con la fecundación. Previo a la fecundación se preparó una placa con gotas del medio FIV-SOF y se colocó en el incubador a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub>, humedad a saturación.

#### ***Proceso de co-incubación del semen con el agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™):***

1.-Se colocó la ampolla de agente sexador de semen (HeiferPlus™) en un Baño María (35,6-38,6°C) durante 30 segundos para atemperar el producto según lo recomendado por EMLAB Genetics.

2.-Se tomó una pajuela (semen procesado y probado en el mismo laboratorio; 25x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml) y se depositó el semen en la ampolla que contenía el agente sexador de semen, se mezcló y depositó en un tubo eppendorf.

3.-Se procedió a la co-incubación en la estufa (35,6-38,5°C), para este estudio se realizaron tres tratamientos con diferentes tiempos de co-incubación T1=10 minutos, T2=20 minutos y T3=30 minutos, además, de un testigo T4=semen no tratado (sin HeiferPlus™). Para que las muestras terminen la co-incubación al mismo tiempo se inició todo el proceso (desde la descongelación de la pajuela), con 10 minutos de diferencia entre los tratamientos, de allí que se colocó primero el tratamiento (T3) de 30 min, diez minutos después se colocó T2= 20 min y finalmente T1=10 min, de esta manera se consiguió tener todos los tratamientos co-incubados (terminado el proceso) al mismo tiempo para continuar con el proceso.

#### ***Proceso de selección de espermatozoides (columnas de Percoll):***

1.-Se preparó el gradiente para la clasificación espermática, mediante columnas de de Percoll, 30-60-90%, basada en la técnica descrita por Missio *et al.*, (88).



2.-Se colocó el semen (pasado el proceso de co-incubación, además del testigo) en el tubo que contiene el gradiente de Percoll, de modo que este quede depositado en la parte superior de la misma.

3.-Se realizó la primera centrifugación a 700g/10min, al terminar la misma se tomó el pellet y se re suspendió en medio FIV-SOF.

4.-Se procedió a realizar la segunda centrifugación a 350g/10min, seguidamente se tomó el pellet, de éste se tomaron 5 µl y se mezcló con 95 µl de agua para valorar la concentración en la cámara de Neubauer.

5.-Se calculó la cantidad de muestra seminal para adicionar ( $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml en la FIV).

#### ***Fecundación:***

Los ovocitos se colocaron en las microgotas del medio de fecundación (FIV-SOF suplementado con 10 µg/ml de heparina) y se procedió al co-cultivo con la cantidad de semen correspondiente, se incubaron en la estufa durante 24 h., en condiciones similares a las utilizadas para la maduración.

#### **3.2.2.4 Valoración de la calidad espermática**

##### ***Vitalidad:***

La vitalidad espermática se determinó mediante el uso de eosina-nigrosina, para esto se colocaron 5 µl de muestra sobre 5 µl de eosina-nigrosina, posteriormente, se ejecutó un frotis y se observó en el microscopio para determinar cantidad de espermatozoides vivos (blancos) y muertos (rosados), el resultado se expresó en porcentaje.



### ***Motilidad individual progresiva (MIP):***

Se analizó la motilidad individual progresiva (MIP), con 5  $\mu$ l de muestra colocados en un portaobjetos y cubiertos, se observó en un microscopio con aumento 40X. La valoración se expresó en porcentajes del 0-100%.

### ***Anormalidad espermática:***

Las anomalías espermáticas se determinaron mediante el uso de eosina-nigrosina, al igual que para valorar la vitalidad se colocó 5  $\mu$ l de muestra sobre 5  $\mu$ l de eosina-nigrosina, se ejecutó un frotis y se observó en el microscopio; el resultado se expresó en porcentaje.

### ***Prueba de Host:***

Para la valoración de la integridad de membrana se aplicó el test de Host; que consistió en colocar en un tubo Eppendorf 10  $\mu$ l de semen diluido y 100  $\mu$ l de solución de Host, se homogenizó la mezcla y se mantuvo a baño María por 30 min, finalmente, se colocó una gota de la preparación en un portaobjetos y se observó al microscopio.

### ***Valoración de la integridad de la membrana del acrosoma:***

Además se valoró la integridad de la membrana acrosomal, para ello se colocó 5  $\mu$ l de muestra en un portaobjetos, se cubrió, se dejó secar y se observó al microscopio óptico de contraste de fases con 1000 aumentos.

#### **3.2.2.5 Cultivo *in vitro***

Después de 24 horas post fecundación, se realizó el desempaque; es decir, los presuntos cigotos fueron desnudados mediante pipeteo y se colocaron en una placa con gotas de cultivo previamente



preparadas, la placa se llevó a la cámara trigas a 38,5°C en una atmósfera de 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub> y humedad a saturación.

El clivaje se evaluó 48 horas después de la fecundación, observando el porcentaje de ovocitos que presenten división celular y se continuó con el cultivo hasta el día 7 para evaluar el porcentaje de producción de embriones.

### 3.2.2.6 Sexo de embriones

Para conocer el sexo de los embriones obtenidos en el proceso se usó la amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP); se realizaron dos reacciones, el control de proceso (reacción común de bovino) y una reacción específica para macho. La detección de productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio.

1.- La extracción de ADN se realizó calentando los embriones durante 5 min a 95°C-100°C.

2.- Se realizó la premezcla para el ensayo de amplificación según lo siguiente:

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial	final	por reacción
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	4,1 µl x n
Buffer de amplificación 10 x	10X	1X	1,25 µl x n
Solución de Betaína	4 M	800 mM	2,5 µl x n
dNTP`s	10 mM	1,4 mM	0,35 µl x n
Oligonucleótido FIP	100 µM	1,6 µM	0,2 µl x n
Oligonucleótido BIP	100 µM	1,6 µM	0,2 µl x n
Oligonucleótido F3	25 µM	0,2 µM	0,1 µl x n
Oligonucleótido B3	25 µM	0,2 µM	0,1 µl x n
Oligonucleótido LF	100 µM	0,8 µM	0,1 µl x n
Oligonucleótido LB	100 µM	0,8 µM	0,1 µl x n
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	3 µl x n
Volumen final	-----	-----	12,0 µl x n

\*n= número de muestras.





3.- En tubos eppendorf se colocó la muestra de ADN y la premezcla, los mismos se incubaron en el termociclador con el fin de producir la desnaturalización (5 min/94°C) y el alineamiento (5 min/4°C).

4.- Se retiraron los tubos del termociclador y se añadió la enzima (Bsm ADN polimerasa) para que se dé la extensión (60 min/60°C) y la inactivación (10 min/80°C).

Reactivo:	Concentración		Volumen por reacción
	Inicial	final	
Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa	8 U/ $\mu$ l	0,32 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
<b>Volumen final:</b>	----	---	12,5 $\mu$ l

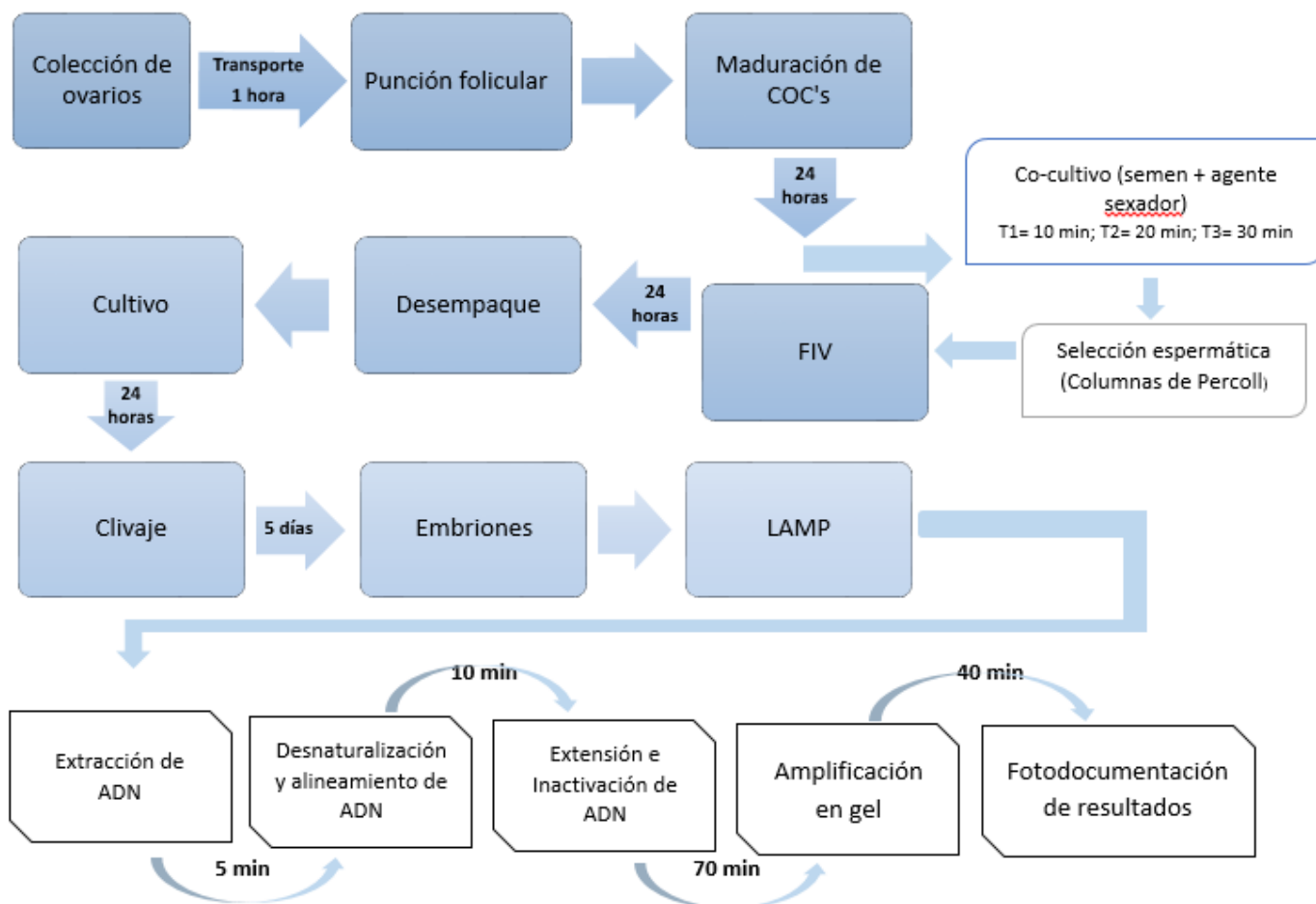
5.- Se preparó el gel de agarosa al 1,5% en solución buffer TAE al cual se adicionó Bromuro de Etidio, se colocó en la bandeja para gel y se dejó gelificar.

6.- A las reacciones sometidas al proceso de amplificación se les añadió la Solución buffer de carga para ADN.

7.- Se colocaron 12  $\mu$ l de cada una de las reacciones en los pozos del gel y en uno de ellos se colocaron 450 ng del marcador de peso molecular.

8.- El gel fue sometido a 100 Voltios durante 40 minutos.

9.- Finalmente se fotodocumentaron los resultados. Se consideró que el sexo de los embriones fue masculino cuando se logró amplificar el fragmento correspondiente al control de proceso y el específico para macho, por otro lado, cuando solo el control de proceso fue positivo, se consideró que el sexo de los embriones era femenino.



**Figura 9:** Esquema de PIV y LAMP

### 3.3 Diseño experimental

El trabajo fue de tipo experimental, con diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos y un testigo. Los tratamientos se incorporaron previo a la fecundación *in vitro*. Las etapas de MIV y CIV fueron idénticas para los tratamientos en estudio. Se repitieron las sesiones de recolección, MIV hasta completar 200 COC's por tratamiento, con un mínimo de 5 repeticiones por tratamiento con un rango entre 25–40 COC's por réplica.



*Tratamiento 1:* Co-incubación de semen con el agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™) durante 10 minutos.

*Tratamiento 2:* Co-incubación de semen con el agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™) durante 20 minutos.

*Tratamiento 3:* Co-incubación de semen con el agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™) durante 30 minutos.

*Tratamiento 4:* Testigo

**Variables:**

*Independientes:*

- Co-incubación de semen con el agente sexador de semen bovino para hembras (HeiferPlus™), con tres tiempos diferentes (10; 20 y 30 minutos).
- Sesión de producción de embriones *in vitro* (PIV).

*Dependientes:*

- Valoración de la calidad espermática.
- Número de ovocitos clivados pos fecundación *in vitro*.
- Cantidad de blastocistos obtenidos.
- Relación del número de embriones hembras y machos obtenidos.



### **Análisis estadístico:**

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa informático SPSS® versión 25. Se establecieron estadígrafos principales. Para la valoración de las variables cuantitativas se realizó un ANOVA y para comparar medias la prueba de Tukey al 5%. Para comparar las variables cualitativas (porcentuales) se utilizó la prueba de Chi cuadrado.



## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

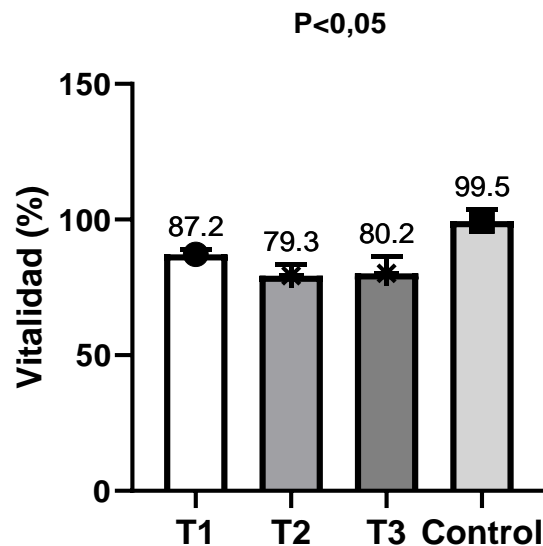
### 4.1 Valoración seminal

#### ***Vitalidad espermática:***

Se ha reportado que las diferentes alternativas para seleccionar espermatozoides X o Y, producen alteraciones espermáticas debido al procedimiento de separación (89), de allí que en la presente investigación en un primer momento se valoró el número de espermatozoides vivos (vitalidad) presentes luego del proceso de co-incubación en los diferentes tratamientos. En una segunda instancia, luego del proceso de selección espermática mediante las columnas de Percoll (30, 60 y 90%), se volvió a evaluar la muestra seminal de cada tratamiento.

Se determinó que luego del tiempo de co-incubación con el agente sexador de semen el número de espermatozoides vivos en T2 (20 min) y T3 (30 min) disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ), frente al control. Sin embargo, la vitalidad en T1 (10 min) fue similar estadísticamente al del control (**Figura 10**).

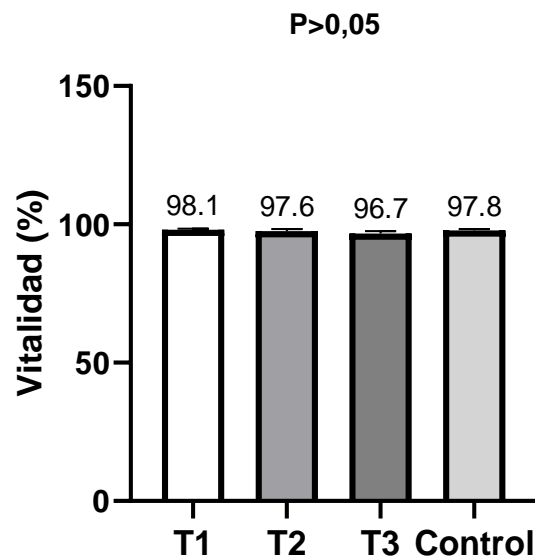
Los resultados obtenidos permiten inferir que la co-incubación de la muestra seminal con el agente sexador produce daños en los espermatozoides incrementando el número de espermatozoides muertos presentes; así pues, cuando se co-incubó por 10 min, el promedio de espermatozoides muertos (12,9%) fue similar estadísticamente al control (0,5%). Sin embargo, al incrementar el tiempo de co-incubación a 20 y 30 minutos (T2 y T3 respectivamente), el promedio se incrementó sustancialmente (T2=20,7% y T3=19,8%).



**Figura 10:** Porcentaje promedio de espermatozoides vivos (Vitalidad), luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a●=ab■=b).

En la producción de embriones *in vitro* (PIV), para la fase de fecundación (FIV), se usan habitualmente técnicas de separación o selección seminal, como la gradiente de coloides (columnas de Percoll), esto permite aumentar la calidad del espermatozoide, ya que eliminan aquellos espermatozoides con alteraciones o muertos (90), lo cual permite en cierta forma contar con espermatozoides de mejor calidad para la fecundación *in vitro* (FIV).

Este principio se pudo evidenciar en el presente trabajo, al valorar vitalidad en los diferentes tratamientos luego de pasar las muestras seminales por la columna de Percoll, llegando a determinar que el promedio de espermatozoides vivos en T1 (98,1%), T2 (97,6%), T3 (96,7%) y control (97,8%) fueron similares ( $P < 0,05$ ), **figura 11**.



**Figura 11:** Porcentaje promedio de espermatozoides vivos (Vitalidad), luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a●=ab■=b).

Es importante resaltar que previo a la selección espermática mediante las columnas de Percoll en T2 y T3 el promedio de espermatozoides vivos fue del 79,3% y 80,2% y luego se incrementó a 97,6% y 96,7%, respectivamente. Por lo tanto, el uso de la columna de Percoll como técnica de selección espermática permitió contar con un 18,3% y 16,5% de espermatozoides viables en T2 y T3 respectivamente. En el grupo control los valores fueron similares estadísticamente (**figura 10 y 11**).

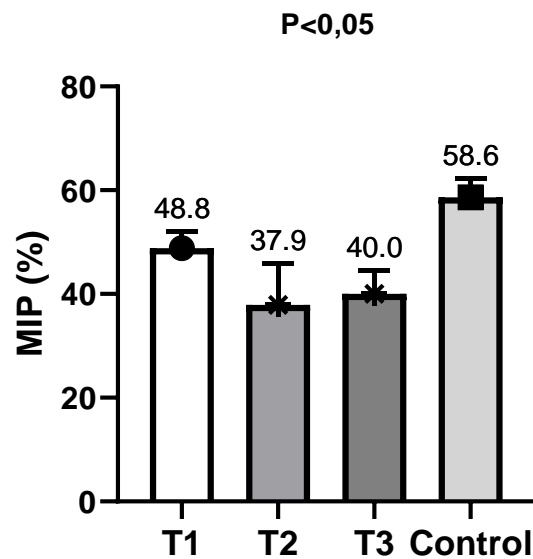
Schenk *et al.*, (91) mencionaron que parámetros como la vitalidad puede verse afectada por el efecto de sexaje del semen y su criopreservación, es por ello que en la FIV se necesita un método de lavado y selección de los espermatozoides, como el gradiente diferencial de Percoll (92), el cual separa a los espermatozoides con mejor movilidad de aquellos muertos e inmóviles. Parrish *et al.*, (93), describieron el incremento de porcentaje de vitalidad post aplicación de la selección espermática con Percoll, lo



cual corrobora lo obtenido en el presente estudio; además, Kochlar *et al.*, (94) mencionaron que Percoll permite retirar los diluyentes y crioprotectores que pueden ocasionar disminución en la fertilidad.

### **Motilidad Individual Progresiva (MIP):**

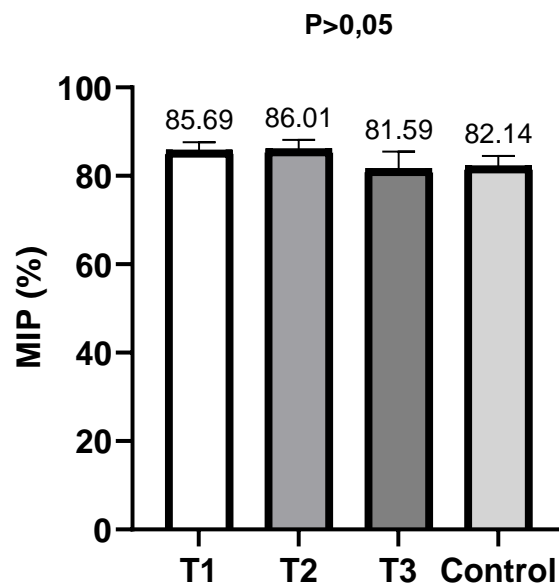
Al valorar la Motilidad individual progresiva (MIP) luego del tiempo de co-incubación se observó que ésta disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en T2 ( $37,9 \pm 8,08\%$ ) y T3 ( $40,0 \pm 4,49\%$ ) en comparación con el control ( $58,6 \pm 3,65\%$ ), sin embargo, T1 mantuvo valores ( $48,3 \pm 3,24\%$ ) similares ( $P > 0,05$ ) al control (**Figura 12**). Estos resultados siguen reforzando el criterio de que a mayor tiempo de exposición de la muestra seminal al agente sexador mayores daños en el espermatozoide.





**Figura 12:** Motilidad individual progresiva (MIP), de los espermatozoides expresada en porcentaje, luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a●=ab■=b).

Luego de la selección espermática por medio de las columnas de Percoll, se observó que la MIP en los tratamientos y el control se nivelaron ( $P>0,05$ ); T1 ( $85,7\pm 1,89\%$ ), T2 ( $86,0\pm 2,14\%$ ), T3 ( $81,6\pm 3,87\%$ ), Control ( $82,1\pm 2,37\%$ ), **figura 13**.



**Figura 13:** Motilidad individual progresiva (MIP), de los espermatozoides expresada en porcentaje, luego del proceso de selección mediante las columnas de Percoll en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Tukey al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a●=ab■=b).

Hafez y Hafez (95) indicaron que para evaluar la MIP se usa una escala de 0 a 100%, donde las motilidades  $>70\%$  son excelentes, entre 50 a 70% buenas, 30 a 50% regulares y  $< 30\%$  malas,



basado en ello se observó que luego del tiempo de co-incubación con el agente sexador, el control presentó motilidad buena, mientras que los tratamientos T1, T2 y T3 presentaron motilidad regular, sin embargo luego de la selección espermática por medio de las columnas de Percoll, los tratamientos y el control presentan motilidad excelente (>70%).

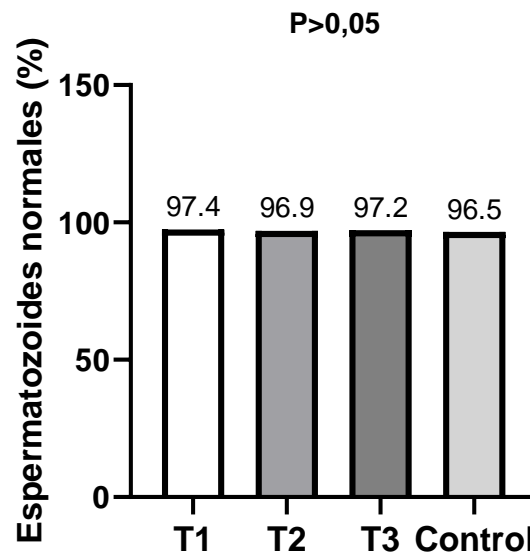
Los espermatozoides sexados presentan un menor porcentaje de motilidad progresiva, así lo mencionan Rodríguez *et al.*, (96); Palma *et al.*, (15); Shenk *et al.*, (91) y Seidel *et al.*, (97) quienes establecen en sus estudios que usar métodos para el sexaje de semen como la citometría de flujo causa una disminución en la motilidad comparado con el semen no sexado, así también lo señala De Jarnette *et al.*, (98), indicando que el semen sexado presenta un periodo de vitalidad más corto y diferentes patrones de motilidad en comparación con semen convencional; sin embargo durante la FIV los espermatozoides se someten a un proceso de selección (gradiente de Percoll) lo que causa que solo los espermatozoides viables, con motilidad superior y mejor calidad fisiológica sean seleccionados para la fecundación según lo mencionan Pellegrino *et al.*, (99); Cesari *et al.*, (100) y Prakash *et al.*, (101), ratificando el aumento de la motilidad post Percoll obtenido en éste estudio.

Gerard *et al.*, (102), evaluaron la eficacia de HeiferPlus™ en cuanto calidad de semen valorando motilidad y viabilidad espermática luego de 20 minutos de co-incubación, concluyendo que dichos parámetros disminuyeron significativamente en comparación con el control, lo cual concuerda con los valores obtenidos en éste estudio. En contraposición Curry (103), quien realizó un análisis de semen, concluye que no hubo diferencias en la motilidad del semen tratado con HeiferPlus™ frente al Control (sin tratar).

### ***Anormalidad espermática:***

Se valoró las anomalías espermáticas ya que su análisis es fundamental para determinar el potencial de los machos en cuanto a su fertilidad (104). Luego del tiempo de co-incubación se observó que no existió diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los tratamientos; T1 (97,4%), T2 (96,9%), T3

(97,2%), Control (96,5%), en cuanto al porcentaje de espermatozoides normales, **figura 14**, es decir que el producto no incrementa la presencia de anomalías.

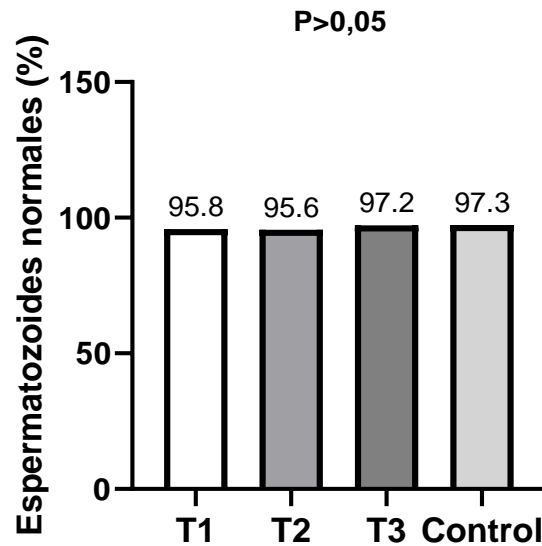


**Figura 14:** Porcentaje de espermatozoides normales luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=*indica diferencia entre grupos.*

Luego de pasar las muestras seminales por la columna de Percoll, valorando anomalías en los diferentes tratamientos se pudo determinar que el promedio de espermatozoides normales en T1 (95,8%), T2 (95,6%), T3 (97,2%) y control (97,3%) fueron similares ( $P > 0,05$ ), **figura 15**.

Para que un espermatozoide pueda cumplir con su función biológica, éste debe ser morfológicamente normal (51,105), ya que un alto porcentaje de espermatozoides anormales disminuye la capacidad fecundante del eyaculado según lo menciona Morrow (106). Muiño *et al.*, (107) sugieren que es necesario que el 70% de espermatozoides sean normales para que una muestra de semen sea

procesada. Se puede observar que los valores obtenidos en éste estudio superan el valor aceptable, demostrando que el producto no causa alteraciones en la morfología seminal.

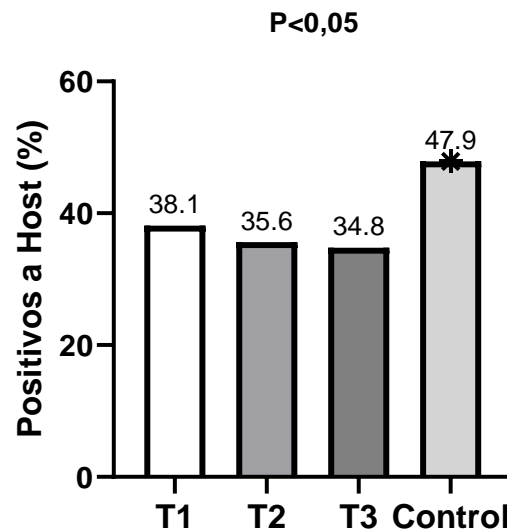


**Figura 15:** Porcentaje promedio de espermatozoides normales, luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=*indica diferencia entre grupos.*

### **Integridad de la membrana (HOS-T):**

La membrana externa de los espermatozoides cumple funciones como el metabolismo y capacitación espermática y su integridad está relacionada con la viabilidad del semen (108), la prueba de hinchazón hipoosmótica (HOS-T) permite determinar el estado de la misma. Es así que en el presente estudio se aplicó dicha prueba (HOS-T), antes y después de la selección espermática con las columnas de Percoll.

Se pudo observar que luego del tiempo de co-incubación con el agente sexador de semen la integridad de la membrana plasmática fue similar ( $P>0,05$ ), en T1 (38,1%), T2 (35,6%) y T3 (34,8%), sin embargo presentan diferencia significativa frente al Control (47,9%) (**Figura 16**), lo que indica que el producto causa daño en la membrana plasmática.



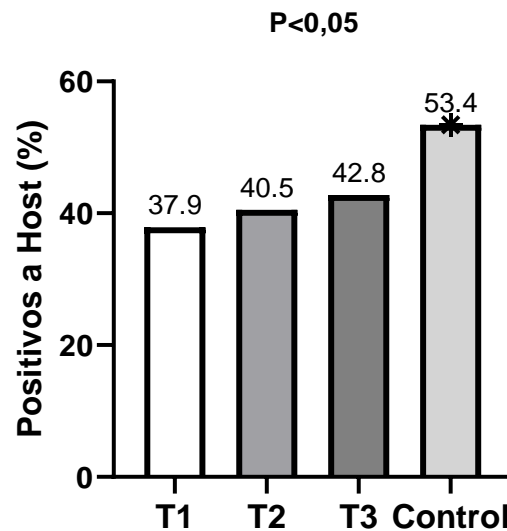
**Figura 16:** Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivamente a la prueba de Host, luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=indica diferencia entre grupos.

Morado *et al.*, (109) indicaron que la prueba hipoosmótica (HOST), ha mostrado gran efectividad en la valoración de la integridad de la membrana plasmática, la cual es esencial para la fecundación puesto que la misma realiza los procesos de capacitación y reacción acrosomal que permiten penetrar la zona pelúcida del ovocito (110).

Minervini *et al.*, (111), estudiaron el efecto de HeiferPlus™ sobre parámetros funcionales de espermatozoides de búfalos encontrando una reducción significativa en la viabilidad del espermatozoide, la

cual se relacionó con la integridad de la membrana externa por lo tanto concluyeron que HeiferPlus™ probablemente anticipa la capacitación espermática y la reacción acrosomal. Corroborando los hallazgos del presente estudio respecto a la integridad de la membrana externa; sin embargo, no se demostró un efecto sobre la integridad de la membrana acrosomal (reacción acrosomal).

Después de la selección espermática con las columnas de Percoll se observó que el porcentaje de espermatozoides con su membrana íntegra fue T1=37,9%, T2=40,5% y T3=42,8% mostrando que disminuyó significativamente frente al Control (53,4%), similar a lo ocurrido antes del Percoll (**Figura 17**).



**Figura 17:** Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivamente a la prueba de Host, luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=indica diferencia entre grupos.

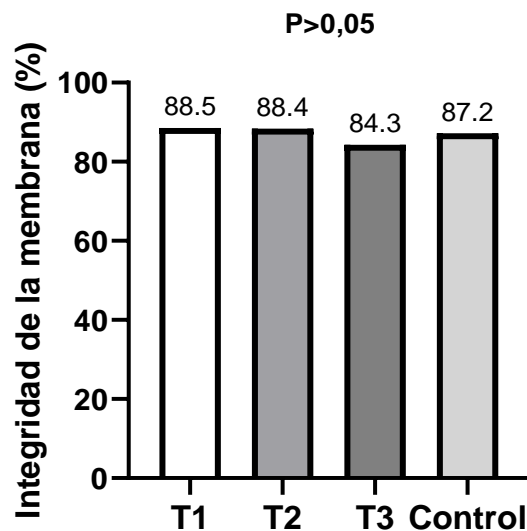
Ángell *et al.*, (10) evaluaron el efecto de la selección espermática por gradiente de Percoll sobre la membrana plasmática con semen sexado, encontrando que no existe diferencia estadística entre



espermatozoides no centrifugados y los centrifugados por 10 min 700g, estos datos concuerdan con lo encontrado en éste estudio, ya que no se observa diferencia en el porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivamente a la prueba de Host, antes y después la selección espermática con la columna de Percoll, lo que es corroborado también por Urrego *et al.*, (112) quienes evaluaron semen la integridad de la membrana de semen no sexado y no observaron diferencia entre espermatozoides centrifugados y no centrifugados.

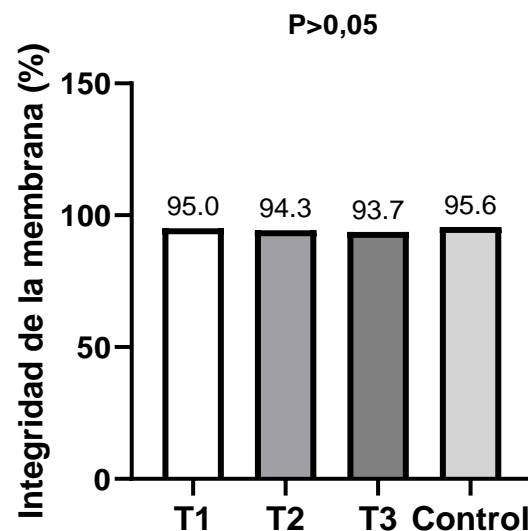
***Integridad de la membrana acrosomal:***

Una membrana acrosomal íntegra brinda a los espermatozoides la capacidad de unirse y penetrar en los ovocitos mediante la reacción acrosomal, lo que indica que su análisis puede predecir la capacidad de fecundación de las muestras de semen bovino (113). Por ello en éste estudio se valoró la integridad de la membrana acrosomal luego del tiempo de co-incubación sin embargo no se observó diferencia estadística ( $P>0,05$ ) entre los tratamientos T1 (88,5%), T2 (88,4%) y T3 (84,3%) frente al Control (87,2%) (**Figura 18**).



**Figura 18:** Porcentaje de espermatozoides con membrana acrosomal íntegra, luego del tiempo de co-incubación en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=indica diferencia entre grupos.

Al valorar la integridad de la membrana acrosomal luego de pasar las muestras seminales por la columna de Percoll, se pudo evidenciar que el promedio de espermatozoides con su membrana acrosomal íntegra en T1 (95%), T2 (94,3%), T3 (93,7%) y control (95,6%) fueron similares ( $P < 0,05$ ), figura 19.



**Figura 19:** Porcentaje de espermatozoides con membrana acrosomal íntegra, luego de la selección espermática con la columna de Percoll, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. \*=indica diferencia entre grupos.

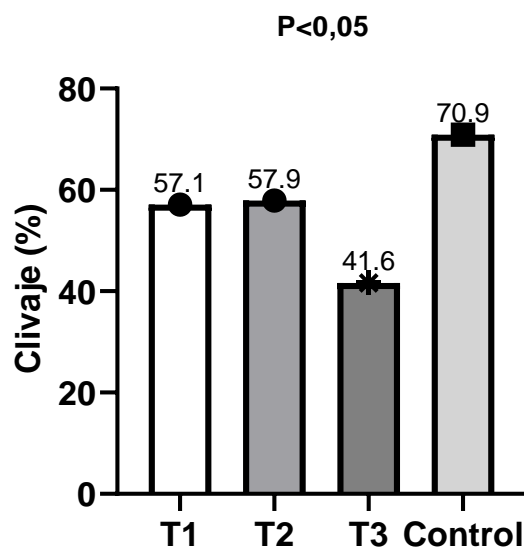
Según Schenk *et al.*, (91) al sexar el semen mediante citometría de flujo existe una disminución en la integridad acrosomal en comparación con el semen convencional; lo que concuerda con Carvalho *et al.*, (114) y Hollinshead *et al.*, (115) quienes mencionan que los espermatozoides sexados presentan



daño acrosomal, además Mocé *et al.*, (116) indican que el proceso de sexado acelera la reacción acrosomal; todo esto en contraposición con nuestro estudio en donde no se encontró diferencia entre tratamientos con semen sexado con HeiferPlus™ en cuanto a la integridad de la membrana acrosomal.

#### 4.2 Porcentaje de clivaje y embriones obtenidos

El clivaje se valoró a las 48 horas post fecundación, donde se observó que los tratamientos T1 y T2 (57,1% y 57,9%) mantuvieron promedios similares ( $P>0,05$ ), sin embargo muestran diferencia ( $P<0,05$ ) con T3 (41,6%) donde el porcentaje disminuyó significativamente; además, éstos difieren de estadísticamente del Control ( $P<0,05$ ) donde se obtuvo el porcentaje de clivaje más alto (70,9%), **figura 20**.



**Figura 20:** Porcentaje promedio de clivaje, en cada uno de los tratamientos T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a●=b■=c).

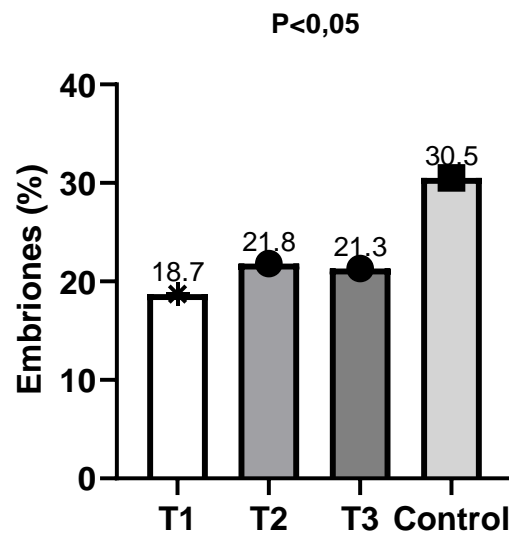


Se ha visto factible el uso de semen sexado en la FIV, debido al reducido número de espermatozoides necesarios para la FIV, sin embargo estudios como el de Lu *et al.*, (117), muestran que existe una tasa de clivaje menor usando dicho semen, similar a lo mencionado por Palma *et al.*, (15) y Zhang *et al.*, (118) quienes tuvieron una disminución significativa en las tasas de clivaje al usar semen sexado en comparación al uso de semen convencional. Araujo *et al.*, (12), en su estudio menciona que el sexado de semen a través de la citometría de flujo interfiere en la calidad seminal, por lo tanto en la fertilidad lo que ocasiona menores tasas de desarrollo embrionario tanto *in vivo* como *in vitro*, similar a lo obtenido en éste trabajo con el uso de HeiferPlus™ donde se observa una menor tasa de clivaje cuando existe mayor tiempo de co-icubación del semen con el producto.

En contraposición, estudios como el de Wilson *et al.*, (119), no obtuvieron diferencia en la tasa de clivaje al usar semen sexado y no sexado, coincidiendo con Larocca *et al.*, (70) y Wheeler *et al.*, (120), quienes tampoco observaron diferencia significativa usando semen sexado por citometría de flujo. Así también en un estudio realizado por Chowdhury *et al.*, (121), usando un anticuerpo monoclonal (WholeMom®) para sexar el semen no hubo diferencias en cuanto al porcentaje de clivaje, como tampoco se encontró diferencias en el porcentaje de embriones obtenidos en el día siete.

Sin embargo Oses *et al.*, (5) en su estudio encontraron que la tasa de división con semen sexado fue mayor que la obtenida con semen convencional, no obstante al analizar el porcentaje de blastocistos los resultados fueron contrarios.

El porcentaje de producción de embriones se valoró al día 7 post fecundación, donde se pudo observar que en T1 se obtuvo un promedio de 18,7%, lo que indica que el porcentaje disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) frente al Control. Sin embargo el porcentaje de T2 y T3 (21,8% y 21,3%) fue similar estadísticamente al del Control (30,5%), **figura 21**.



**Figura 21:** Porcentaje promedio de embriones, en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a<sup>o</sup>=ab<sup>o</sup>=b).

Palma *et al.*, (122) indican que un 30 a 40% de ovocitos en la PIV alcanzan un estadio de blastocisto usando semen convencional corroborando lo obtenido en este estudio con en el grupo Control (30,5%); sin embargo, según Wheeler *et al.*, (120), mencionaron que el porcentaje disminuye al 10-20% al usar semen sexado con citometría de flujo, coincidiendo parcialmente con nuestro estudio puesto que en T1 se obtuvo un promedio de 18,7%, no obstante en T2 y T3 se tienen valores ligeramente mayores al 20% (21,8% y 21,3% respectivamente).

Araujo *et al.*, (12) y Palma *et al.*, (15) comprobaron que el desarrollo de blastocistos en el día siete fue significativamente inferior usando semen sexado en relación al grupo control, lo que coincide a lo estudiado por Trigal *et al.*, (123), quienes obtuvieron mayor clivaje y mayor desarrollo de embriones en el semen no sexado, respecto al sexado.



No obstante Kastska-Ksiaz *et al.*, (124) utilizando semen sexado congelado-descongelado encontraron diferencias en cuanto al clivaje, sin embargo el porcentaje de blastocistos fue similar para el semen sexado y no sexado, coincidiendo con lo obtenido por Puglisi *et al.*, (125) en cuanto a clivaje y blastocistos.

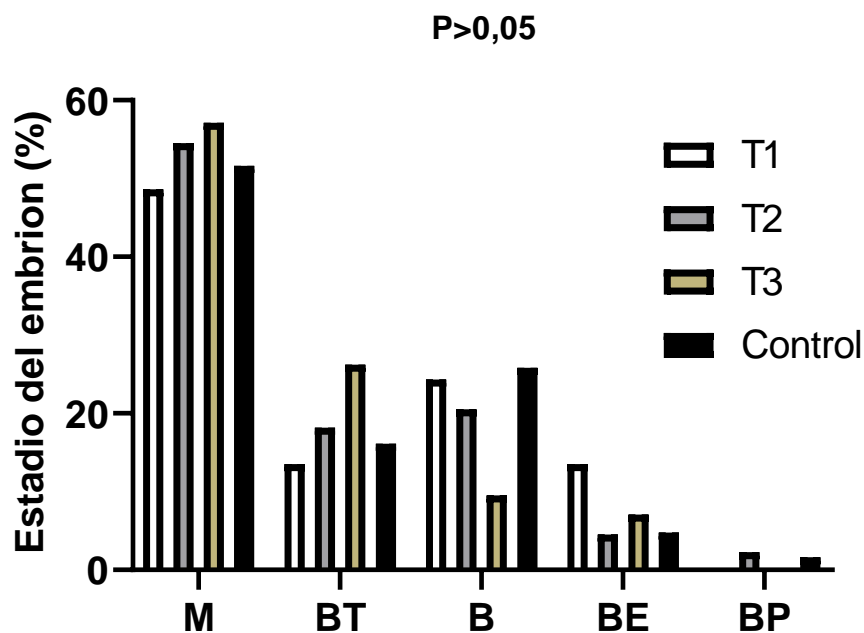
Curry (103), valoró el número de embriones recogidos en vacas hiperestimuladas e inseminadas con semen tratado con HeiferPlus™, sin embargo no afectó dicho número respecto al control, en contraposición a lo encontrado en éste estudio ya que se observa influencia del producto HeiferPlus™ sobre el número de embriones obtenidos en PIV, lo que coincide con Gerard *et al.*, (102) donde se observó que el semen tratado con HeiferPlus™ dio menores tasas de ovocitos fertilizados *in vitro* en comparación con el control.

Otros estudios realizados *in vivo* como el de Jaar y Ventura (126), al evaluar la fertilidad de semen sexado con HeiferPlus™ en vacas de ganado de carne, concluyen que aumentan los servicios por vaca preñada, de la misma manera en el trabajo realizado por García (51), se concluyó que el uso de HeiferPlus™ en el sexado de semen no aumentó el porcentaje de fertilidad. Un estudio realizado en búbalos por Barile *et al.*, (127) indica que el uso de HeiferPlus™ da como resultado una menor tasa de concepción en comparación con el control (semen convencional). Esto no coincide con lo informado por EMLAB Genetics (17) quienes aseguran que la tasa de concepción no se ve afectada e incluso existe un ligero aumento en la misma.

Turk *et al.*, (128), no encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de preñez al usar HeiferPlus™. Díaz (6) en su estudio a pesar de no encontrar diferencia estadística en cuanto a tasa de concepción, si pudo observar un incremento del 20% en animales inseminados con semen tratado con HeiferPlus™, lo que coincide con Curry *et al.*, (129) quienes inseminaron a vacas sincronizadas (protocolo Ovsynch) y se observó un aumento en el porcentaje de preñez en las vacas

inseminadas con HeiferPlus™. Así también Campos y Vargas (77), en su trabajo reportan que el uso de HeiferPlus™ para el sexado de semen en bovinos presentan ventaja en el aumento de la fertilidad.

En la **figura 22**, se puede observar el porcentaje de cada estadio de desarrollo de los embriones de los tratamientos, donde a pesar de que no muestran diferencia estadística, se aprecia que existe un mayor número de Mórulas, indicando que pudo existir un retraso en el tiempo de fecundación.



**Figura 22:** Porcentaje de cada estadio de desarrollo de los embriones (M=mórula; BT=Blastocisto temprano; B=Blastocisto; BE=Blastocisto expandido; BP=Blastocisto protruido), en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*= $a^{\circ}$ = $ab^{\square}$ = $b$ ).

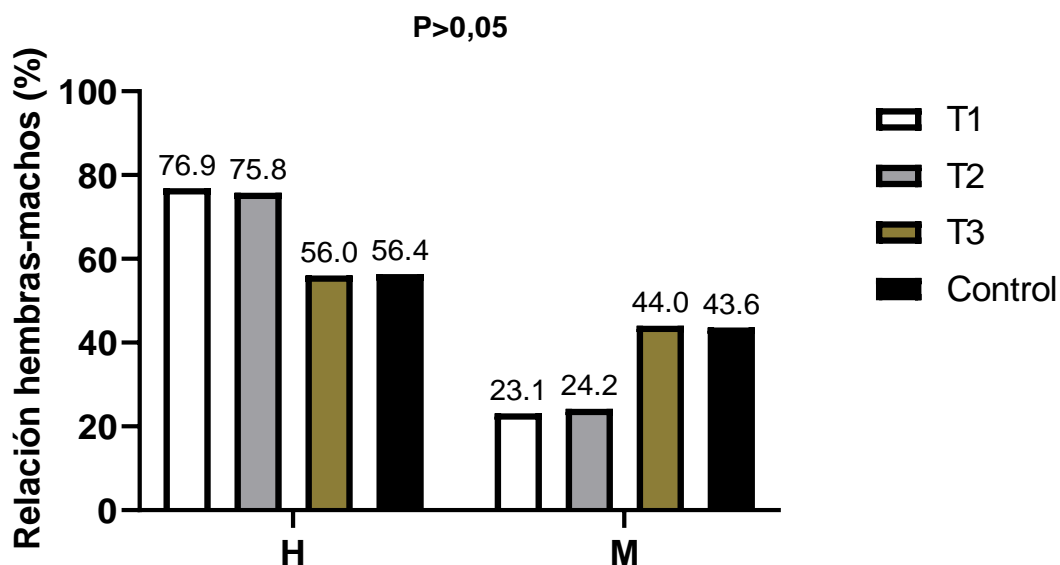
Barceló-Fimbres *et al.*, (130) realizaron un estudio en el cual se evaluó la FIV usando espermatozoides bovinos sexados (tanto para X como para Y), donde se encontró que los blastocistos producidos con espermatozoides



Y tienen un ligero avance y mejor calidad que aquellos producidos con esperma X, además se ha informado que los embriones masculinos producidos *in vitro* presentan un desarrollo más rápido que los femeninos (131,132). Lu *et al.*, (117) también indican que los embriones producidos con semen sexado presentan un desarrollo más lento que aquellos producidos con semen convencional. Esto podría explicar por qué en nuestro estudio se presentó un mayor porcentaje de Mórulas en relación a estadios más avanzados, sin embargo se observa lo mismo en el Control.

### 4.3 Relación hembras-machos

El porcentaje de embriones hembras y machos obtenidos en cada uno de los tratamientos no muestra diferencia estadística, sin embargo se puede observar que existe un incremento de aproximadamente el 20% en la producción de embriones hembra en los tratamientos T1 y T2 (76,9% y 75,8% respectivamente) respecto al Control (56,4%), **figura 23**. Esto coincide con lo descrito por EMLAB Genetics (17) quienes afirman que el uso de HeiferPlus™ aumenta la probabilidad de nacimiento de terneros con una proporción de sexos deseada de al menos 20-25%.





**Figura 23:** Porcentaje de embriones hembras y machos obtenidos en cada uno de los tratamientos. T1=10 min. T2=20 min. T3=30 min. Control. Prueba de Chi cuadrado al 5%. Simbología de significancia entre grupos (\*=a<sup>•</sup>=ab<sup>■</sup>=b).

La proporción de sexos usando semen convencional *in vivo* es aproximadamente 1:1 (133), aunque se menciona también que puede distribuirse 47% para hembras y 53% (78). *In vitro* la proporción se mantiene 1:1 sin embargo bajo ciertas condiciones esto puede diferir (134).

Gerard *et al.*, (102) en su trabajo encontró que uso de HeiferPlus™ indujo una desviación significativa del porcentaje de embriones hembra producidos *in vitro* en un 18,3% frente al control.

Existen estudios *in vivo* como el de Turk *et al.*, (128) donde encontraron un ligero incremento no significativo (7,6%) en la proporción de crías hembras al usar HeiferPlus™. Coincidiendo con el trabajo de Díaz (6), quien comprobó que la adición del HeiferPlus™ al semen si favorece el nacimiento de terneras hembras.

García (51), menciona que el uso de HeiferPlus™ no influye en el sexo de la cría presentando valores similares los obtenidos con semen convencional. Lo que coincide con Campos y Vargas (77), quienes en su estudio concluyen que HeiferPlus™ no influye en el sexo de la cría presentando resultados inferiores a los presentados por EMLAB Genetics. Curry *et al.*, (135) determinaron la eficacia de HeiferPlus™ en vacas superovuladas, donde los resultados indicaron que el producto no influye en la proporción de sexos a favor de crías hembras.



## 5 CONCLUSIONES

- La exposición de semen al agente sexador HeiferPlus™ durante 20 y 30 minutos afecta la vitalidad y motilidad individual progresiva de los espermatozoides.
- La co-incubación del semen con HeiferPlus™ durante 10, 20 y 30 minutos produce daños en la membrana plasmática de los espermatozoides.
- El uso de HeiferPlus™ en la fecundación *in vitro* disminuye el porcentaje de clivaje.
- Sin embargo, el porcentaje de embriones obtenidos al final del proceso de producción *in vitro* no se ve afectado con el uso de HeiferPlus™.
- La co-incubación del semen con agente sexador (HeiferPlus™) por 10 minutos, previo a la FIV produce un incremento del 20,5% de embriones hembras en relación al tratamiento testigo; sin embargo, esta diferencia no es estadística.





## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Alberio R. Producción in vitro de embriones bovinos. Sitio Argentino Prod Anim. 1999;
2. Fernández A, Díaz T, Muñoz G, Muñoz G. Producción In vitro de embriones bovinos. Rev Fac Cs Vets UCV. 2007;48(1):51–60.
3. Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch Med Vet. 2006;38(2):97–104.
4. Herradón PG, Quintela LA, Becerra J, Ruibal S, Fernández M. Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora genética en bovinos. Arch Latinoamericanos Prod Anim. 2007;15:33–40.
5. Oses M V, Teruel MT, Cabodevila JA. Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro\*. Sitio Argentino Prod Anim. 2009;
6. Díaz M. Efecto de la adición del HeiferPlus al semen de ganado vacuno sobre la tasa de concepción y la proporción de nacimientos de terneras - Chiclayo. Universidad Nacional de Trujillo; 2016.
7. Sánchez A, Ruiz S. Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU), Producción in vitro de embriones (PIV) y semen sexado en la reproducción bovina. Innovación y Tecnol en la Ganad Doble Propósito. 2011;
8. Salazar E. El uso del semen sexado en ganado de leche. ¿Se puede incrementar el nacimiento de terneras? ECAG. 2007;39:21–2.
9. Arroyo A. Sexado de semen una nueva herramienta para la producción de carne. Rev AnGus. 2008;241:37–9.
10. Ángell D, Pérez N, Pareja A, Camargo O, Urrego R. Efecto de la preparación espermática



previo a la fertilización in vitro sobre la membrana plasmática y el ADN de semen bovino sexado. CES. 2009;4.

11. Ferré L, Cattaneo L. Producción in vitro de embriones y semen sexado: ¿La pareja perfecta? Genética Bov. 2018;
12. Araujo M, Volpato R, Lopes M. Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado. Rev Educ Contin em Med Veterinária e Zootec do CRMV-SP. 2013;11(3):08-15.
13. Martínez O, Antillón J, Rodríguez F. Tasa de fertilización, desarrollo y calidad de embriones bovinos Holstein producidos in vitro con semen sexado y adición de IGF-I. Tecnociencia. 2016;9:140–7.
14. Santos P, Silva M, Santos A, Inocêncio S, Pessoa M, Coutinho C. Produção in vitro de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8 girolando. Cienc anim bras. 2015;16(3):358–68.
15. Palma GA, Olivier NS, Neumüller C, Sinowatz F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol. 2008;37(1):67–73.
16. 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(4):44–50.
17. EMLAB Genetics. HEIFERPLUS [Internet]. Disponible en: <http://www.emlabgenetics.com/Pages/HEIFERPLUS.aspx>
18. Reidhead P. \$6.50/Vial: HeiferPlus™ Dramatically Boosts Heifer Calf Numbers. The Milkweed. 2007;



19. Argudo D, Balvoa T, Tenemaza C, Méndez S, Soria M, Ayala L, et al. Influencia del cuerpo lúteo activo sobre la competencia y características morfológicas de ovocitos bovinos. *Maskana Prod Anim.* 2017;117–20.
20. Peláez VA. Producción in vitro de embriones bovinos. Universidad de Cuenca. 2011.
21. Filipiak Y, Larocca C. Biotecnología en reproducción bovina. Montevideo: MEAAP-UDELAR; 2012.
22. Carrasco R. Uso de Azul Brillante de Cresilo en la selección de ovocitos bovinos: implicancias en la maduración nuclear y citoplasma in vitro. Universidad Austral de Chile; 2012.
23. Velarde N. Recuperación de ovocitos recolectados de vacas criollas post mórtem del sur del Perú. *Cienc Desarro.* 2015;
24. Collantes J. Viabilidad de los ovocitos bovinos obtenidos post mortem, para la producción de embriones in-vitro. 2011.
25. Orzuna G. Producción in vitro de embriones en bovino. Universidad Agraria Antonio Narro; 2015.
26. Samaniego JX. Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas. Universidad de Cuenca; 2017.
27. Alvarado J. Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero. Universidad de Cuenca; 2017.
28. Ruiz S. Ovum Pick-Up en ganado vacuno. ResearchGate. 2015;
29. Prince Y. Diagnóstico y manejo del proyecto bovino de la Universidad Francisco de Paula



- Santander Ocaña. Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña; 2012.
30. Puerta L. Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular (OPU) y fecundación in vitro (FIV) como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras cebuinas dentro del plan de modernización del hato ganadero colombiano. Universidad de La Salle; 2006.
  31. Barba E. Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos. Universidad de Cuenca; 2016.
  32. Van Wagendonk-De Leeuw AM. Ovum Pick Up and in Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology*. 2006;65:914–25.
  33. Boni R. Ovum pick-up in cattle : A 25 year retrospective analysis. *Anim Reprod Sci*. 2012;9(3):362–9.
  34. Gomez OE, Choque D, Henao F, Escobedo MH, Valverde N. Comparacion de tres metodos de recuperacion de COCs de alpaca recuperados de ovarios postmorten en un camal. 2013;1–2.
  35. Rodríguez L. Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro. Universidad de Santiago de Compostela; 2011.
  36. Estrella CA, Suconota AG. Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular. Universidad de Cuenca; 2018.
  37. Quintana MD, Campos PEC, Herrera P, Gallego C, Padrón E. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Rev Salud Anim*. 2012;34(1):53–6.
  38. Mocha A, Quezada A. Evaluación de la calidad y maduración de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero con tres presiones de vacío. Universidad de Cuenca; 2017.



39. Perea F, Quezada A, Mocha A, Argudo G, Ayala L, Mendez S, et al. Efecto de la presión de vacío sobre las características funcionales de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. *Maskana Prod Anim.* 2017;8(2):69–71.
40. Hernandez A, Nava-trujillo H, Vílchez V. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro. *Prod Agropecu.* 2010;40–5.
41. Ortega M del C. Comparación de dos métodos de recolección (Slicing y Aspiración Folicular) de ovocitos bovinos obtenidos post mortem para la producción de embriones in vitro. Universidad Nacional de Loja; 2016.
42. Samaniego J, Ayala L, Nieto P, Rodas E, Vazquez J, Murillo Y, et al. Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Maskana Prod Anim.* 2017;8(2):77–80.
43. INIA. Reproducción asistida en bovino usando Ovum Pick-Up (OPU) y Fecundación In Vitro. Madrid: Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos; 2009.
44. Sierra D. Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán. Universidad Politécnica Estatal del Carchi; 2015.
45. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Grve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in Cattle. *Vaccine.* 1997;15(10):1057–64.
46. Palma G. Biotecnología de la reproducción. Mar del Plata: INTA; 2001.
47. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles F V., Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology.* 2009;71(5):836–48.



48. González V. Evaluación de la expansión de las células del cúmulo en la maduración in vitro de tres tipos morfológicos de oocitos procedentes de ovarios de vacas de matadero de la ciudad de Loja con dos medios de maduración. Universidad nacional de Loja; 2012.
49. Martínez Y. Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación in vitro. Universidad de Oviedo; 2013.
50. Hernández H. Logros, desafíos y claves de la producción in vitro de embriones (PIVE). 2014;626–35.
51. García P. Evaluación del semen de bovino pos descongelación según temperaturas de transporte. Universidad Nacional de Loja; 2015.
52. Chenoweth PJ. Semen quality assessment. En: The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop. 2002. p. 247–55.
53. Gómez V, Migliorisi L. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Sitio Argentino Prod Anim. 2015;1:4–9.
54. Agüero G. Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA). Universidad Central de Venezuela; 2012.
55. Mellisho E. Evaluación de calidad seminal. En: Manual de laboratorio de reproducción animal. 2010. p. 6.
56. Muiño R. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Universidad de Santiago de Compostela; 2008.
57. Hidalgo C, Tamargo C, Díez C. Análisis del semen bovino. Tecnol Agroaliment. 2005;



58. Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod.* 1995;53:276–84.
59. Rodriguez-Martinez H. Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. En: 2º Congreso Ibérico de Reproducción Animal. 1999. p. 302–16.
60. Williams WW, Pollak OJ. Study of sperm vitality with the aid of eosin-nigrosin stain. *Fertil Steril.* 1950;1(2):178–81.
61. Bedoya N, Vásquez N, Rivera M, Correa G, Trujillo L. Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). *Res Fac Agr Medellin.* 2003;56(2):1983–97.
62. Zubair M, Lodhi LA, Ahmad E, Muhammad G. Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of semen of bull. *J Entomol Zool Stud.* 2013;1(6):124–8.
63. Lechniak D, Kedzierski A, Stanislawski D. The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2002;37(6):379–80.
64. Bernardi S, Allende R, Mazzeo R, Monti J, Marini P. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet.* 2011;13(2):25–38.
65. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD. The hypoosmotic swelling test: An update. *Arch Androl.* 1992;29(2):105–16.
66. Mohammadi G, Mahdion H. Evaluation of membrane integrity of bull frozen-thawed sperm using water and Hypo Osmotic Swelling Test. *BasJVetRes.* 2017;16(2):131–43.
67. Januskauskas A, Johannisson A, Soderquis L, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish



- dairy AI Bulls. *Theriogenology*. 2000;53.
68. Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2000;703–18.
69. Esteves S, Sharma R, Thomas A, Agarwal A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with Hypo-osmotic Swelling Test. *Int Braz J Urol*. 2007;33(3):364–76.
70. Larocca C, Filipiak Y. Semen bovino sexado congelado-descongelado en Producción de Embriones In vitro. *Int J Morphol*. 2017;35(1):371–5.
71. Rentería CA, Soto S. Evaluación del uso de semen sexado contra semen convencional en vaquillas de leche en la finca de Ingeniería Agrícola y Ganadera S.A. (IAGSA), Comayagua, Honduras. 2013;
72. Echeverri JD. Uso de semen sexado en bovinos. Universidad Tecnológica de Pereira; 2015.
73. Vásquez J. Semen sexado: Otra biotecnología reproductiva al servicio del ganadero. *Despertar Leche*. :47–54.
74. Velasco J. El sexaje del semen de toro: ¿Sueño o realidad? *Sitio Argentino Prod Anim*. 2002;2–4.
75. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. el 1 de enero de 1995;43(1):141–52.
76. EMLAB Genetics. Bovine semen sexing agents [Internet]. Disponible en: <https://www.emlabgenetics.com/cattle>





77. Campos J, Vargas D. Evaluación de la implementación de BullPlus™ y HeiferPlus™ como biotecnologías para el sexado de semen en bovinos. Escuela Agrícola Panamericana; 2016.
78. Dalton J. Proporción de sexos al parto cuando se usa semen convencional: ¿Que debo esperar? ABS Glob. 2009;
79. Sharma M, Singh A, Sharma N, Rawat S. Embryo sexing in cattle: Review. Int J Curr Innov Res. 2017;3(12):955–60.
80. Fregoso J. Viabilidad de embriones bovinos congelados con etilenglicol y sexados mediante técnicas de micromanipulación y biología molecular. Universidad de Colima; 2005.
81. Gardón J. Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro. Universidad de Córdoba; 1999.
82. Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, et al. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology. 2004;62(5):887–96.
83. Zoheir KMA, Allam AA. A rapid method for sexing the bovine embryo. Anim Reprod Sci. 2010;119(1–2):92–6.
84. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother. 2009;15(2):62–9.
85. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000;28(12).
86. Kageyama S, Hirayama H. Sexing of Bovine Preimplantation Embryos using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). J Mamm Ova Res. 2012;29(3):113–8.



87. Granja Irquis; Universidad de Cuenca - Google Maps [Internet]. Disponible en: <https://www.google.com/maps/place/Granja+%22Irquis%22+Universidad+de+Cuenca/@-3.0801834,-79.0753254,15z/data=!4m5!3m4!1s0x0:0x8ec02e379b772836!8m2!3d-3.0801834!4d-79.0753254>
88. Missio D, Picolli N, Gallas F, Urquiza C, Fernandes H, Santos F, et al. Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. *Anim Reprod Sci.* 2018;192:146–53.
89. Seidel GE. Overview of sexing sperm. *Theriogenology.* 2007;68(3):443–6.
90. Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci.* 2009;116(1–2):119–28.
91. Schenk JL, Suh TK, Cran D, Seidel Jr GE. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 1999;52.
92. Dode M, Rodovhalo NC, Ueno VG, Fernandes CE. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci.* 2002;69:15–23.
93. Parrish JJ, Krogeneas A, Susko-Parrish L. Effect of bovine sperm separation by either Swim-up or Percoll Method on success of in- vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology.* 1995;44:859–69.
94. Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2003;77:33–49.
95. Hafez E., Hafez B. *Reproduccion e Inseminacion Artificial en animales.* México; 2002. 45 p.



96. Rodríguez-Villamil P, Wei H, Moreira G, Caccia M, Fernandez-Taranco M, Bó GA. Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or nonsexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. *Theriogenology*. 2012;78:165–71.
97. Seidel GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, et al. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*. 1999;52(8):1407–20.
98. 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.
99. Pellegrino CA, Morotti F, Untura RM, Pontes JH, Pellegrino MF, Campolina JP, et al. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro–produced embryos in cattle. *Theriogenology*. 2016;86(3):888–93.
100. Cesari A, Kaiser G, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, et al. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*. 2006;66:1185–93.
101. Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I, et al. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil Steril*. 1998;69:722–6.
102. Gerard O, Salas L, Sellem E, Marquant B, Clement L, Humblot P. In vitro assessment of the effectiveness of a commercially available post-thaw bovine semen sexing kit on semen quality parameters, in vitro fertilizing ability and sex-ratio deviation. 24th Annu Meet AETE. 2008.
103. Curry E. Determining the efficacy of a commercially available post-thaw bovine semen sexing kit. 2007.
104. Freneau GE. Aspectos da morfologia espermática em touros. *Rev Bras Reprodução Anim*.



2011;35(2):160–70.

105. Nuñez A, Rubio A. Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa Andromed® y Continental® One Step. Escuela Agrícola Panamericana; 2015.
106. Morrow D. Therapy in theriogenology diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Filadelfia; 1986. 132-136 p.
107. Muiño R, Tamargo C, Hidalgo C, Peña A. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci.* 2008;109(1–4):27–39.
108. Selvaraju S, Ravindra JP, Ghosh J, Gupta PS, Suresh KP. Evaluation of sperm functional attributes in relation to in vitro sperm-zona pellucida binding ability and cleavage rate in assessing frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) semen quality. *Anim Reprod Sci.* 2008;106(3–4):311–21.
109. Morado S, Pereyra V, Breininger E, Sara R, Cetica P. Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. *Austin J Vet Sci Anim Husb.* 2015;2(1):1005–8.
110. Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology.* 2003;60(8):1539–51.
111. Minervini F, Guastamacchia R, Garbetta A, Barile V. Preliminary evidence on effect induced by HeiferPlus after in vitro exposure on functional parameters of Buffalo's spermatozoa. En: *Buffalo Bulletin.* 2014. p. 509–12.
112. Urrego R, Rios A, Olivera M. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el



- ADN de espermatozoides bovinos. *Rev Colomb Ciencias Pecu.* 2008;21:19–26.
113. Henauh MA, Killian GJ. Effects of sperm preparation and bull fertility on in vitro penetration of zona-free bovine oocytes. *Theriogenology.* 1995;(95):739–49.
114. Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourão GB, Dode MA. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology.* 2010;74:1521–30.
115. Hollinshead FK, Gillan L, O'Brien JK, Evans G, Maxwell WM. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod Fertil Dev.* 2003;15:351–9.
116. Mocé E, Graham JK, Schenk JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology.* 2006;66:929–36.
117. Lu KH, Cran DG, Seidel Jr GE. In vitro fertilization with flow-cytometrically sorted bovine sperm. *Theriogenology.* 1999;52.
118. Zhang M, Lu KH, Seidel GE. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology.* 2003;60:1657–63.
119. 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(6):1007–15.
120. Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe DJ. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology.* 2006;65(1):219–27.
121. Chowdhury MM, Xu L, Kong R, Park BY, Mesalam A, Joo MD, et al. In vitro production of sex



- preselected cattle embryos using a monoclonal antibody raised against bull sperm epitopes. *Anim Reprod Sci.* 2018:0–1.
122. Palma GA, Tortonese DJ, F S. Developmental capacity of in vitro prepubertal oocytes. *Anat Histol Embryol.* 2001;30:1–6.
123. Trigal B, Gómez E, Caamano J, Muñoz M, Moreno J, Carroceras S, et al. In vitro and in vivo quality of bovine embryo in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology.* 2012;78:1465–75.
124. Kastska-Ksiaz L, Rynska B, Bochenek M, Opiela J, Jurkiewicz J. In vitro production of bovine embryos using flow-cytometrically sexed sperm. *Arch Tierz Dummerstorf.* 2006;49(2):133–40.
125. Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi D, Parati K, Bognioni G, et al. In vitro fertilisation with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction.* 2006;132(3):526–526.
126. Jaar C, Ventura S. Evaluación de la fertilidad de semen sexado con HeiferPlus™ en vacas de ganado de carne. 2015.
127. Barile V, Pacelli C, De Santis G, Baldassi D, Mazzi M, Terzano G. Use of commercially available bovine semen sexing agent in buffalo: preliminary report of the effect on the conception rate. En: *Buffalo Bulletin.* 2013. p. 502–4.
128. Turk G, Yuksel M, Sonmez M, Gur S, Kaya SO, Demirci E. Effects of semen sexing kits ( Heiferplus™ and Bullplus™ ) supplemented to frozen-thawed bull semen on pregnancy rates , foetal sex ratios and selected reproductive parameters in cows. 2015;60(2111):309–13.
129. Curry E, Pratt SL, Lapin DR, Gibbons JR. Efficacy of a commercially available post-thaw bovine semen sexing kit in both single-ovulating and hyperstimulated cows. *Anim Reprod Sci.*



2009;116(3–4):376–80.

130. Barceló-Fimbres M, Campos-Chillón LF, Seidel JE. In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: Sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod Domest Anim.* 2011;46(3):495–502.
131. Avery B, Madison V, Greve T. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. *Theriogenology.* 1994;35:953–63.
132. Xu KP, Yadav BR, King WA, Betteridge KJ. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1992;31:249–52.
133. King WA, Yadav BR, Xu KP, Picard L, Sirard MA, Vernini A, et al. The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology.* 1991;36:779–88.
134. Kochhar HP, Peippo J, King WA. Sex related embryo development. *Theriogenology.* 2001;55:3–14.
135. Curry E, Ellis S, Lapin D, Gibbons J. Efficacy Determination of HEIFERPlus™ Semen Sexing Kit in Superovulated Cows. *Soc Study Reprod.* 2006;

## 7 ANEXOS

### *Anexo 1: Materiales y equipos empleados*



**Estufa**



**Cámara trigas**



**Cámara de flujo laminar, Estereoscopio, Placa de Calentamiento, Pipetas**





***Termociclador***



***Sistema de documentación en gel***



***Bandeja para gel, Cámara horizontal y Fuente de poder para Electroforesis.***



## Anexo 2: Agente sexador de semen (HeiferPlus™)

### HEIFERPLUS™

Agente sexador de semen bovino - HEMBRAS

#### INDICACIONES

Para aumentar el porcentaje de terneras en ganado de leche y carne.

#### DOSIS

Una unidad (0.25 ml o 0.50 ml) de semen por ampolla.

#### AVISO

HEIFERPLUS es un agente bio-farmacéutico sin prescripción o receta veterinaria. Puede ser usada sin restricción. La Ley no requiere que este producto sea utilizado por orden de un médico veterinario.

#### DESCRIPCIÓN

HEIFERPLUS es agente espermagénico para sexar semen de toro (Bovinos). Cada dosis está herméticamente sellada en una ampolla para mantener su potencia durante el almacenamiento. El agente se activa mediante la adición de semen directamente a la ampolla de HEIFERPLUS. El semen mezclado con el agente sexador se devuelve a la pajilla original y se insemina como de costumbre.

#### MODO DE ACCIÓN

HEIFERPLUS trabaja mejorando la fertilidad del cromosoma X (femenino) y desacelera la motilidad del cromosoma Y (espermatozoide masculino). El resultado es más óvulos fertilizados por la capacitación del cromosoma X (femenino). La proporción que la cría se una hembra se incrementa en un 20-25 % y la fertilidad se potencia 5-20 %.

#### INSTRUCCIONES DEL KIT

- Ponga HEIFERPLUS a 96-101.5° F (35.6 - 38.6° C) para evitar descargas frías en el semen. Descongele el semen como de costumbre.
- Cortar la punta de la pajilla a 60° bisel con un buen par de tijeras afiladas.
- Inserte el corte final de la pajilla de semen a través del tapón de goma en la ampolla de HEIFERPLUS.
- Ponga el semen en la ampolla agarrando la ampolla y la pajilla en la palma de la mano, "sacudir" 3 o 4 veces (similar a un termómetro de vidrio). Asegúrese de que el semen esté en la ampolla.
- Mezcle suavemente el semen con el contenido en la ampolla.
- Transferencia de semen enriquecido de la ampolla a la pajilla. Haga esto agarrando la ampolla y pajilla en una posición invertida, "sacudir" a la baja 3-4 veces. Asegúrese que toda la esperma se transfiera a la pajilla.
- **IMPORTANTE:** el semen enriquecido se incuba en agua durante 10-15 minutos a temperatura constante de 96-101.5° F (35.6 - 38.5° C). Consulte TABLA 1. No superar 60 minutos de incubación.
- Sacar la pajilla de la incubación, secar y cortar el bisel de la pajilla. Cargue en la pistola de inseminación e insemine como de costumbre.

Nota: Durante la incubación, mantenga la ampolla adjunto a la pajilla. Proteja el semen de la exposición al aire y al agua.

#### TIEMPO DE INSEMINACIÓN

- Por muestra de "calor" observado (natural o sincronizado): Vaquillas insemine 16 horas y vacas 18 horas después de la primera muestra de calor/celo.
- Utilizando OVSYNCHR: insemine novillas 24 horas después de la última inyección de GnRH. Vacas 26 horas después de la última GnRH.
- Vaquillas súper-ovaladas y vacas: aplicando doble inseminación - 16 horas y 24 horas después del primer celo. Aplicando una sola inseminación - aplicar 20 horas después de la primera muestra de calor.
- Utilizando pro-gestágenos (CIDR/Crestor): novillas 66-72 horas y vacas 68-74 horas después de remover el implante de CIDR/Crestor.

**AVISO: EL USO DE ESTE PRODUCTO REQUIERE RETRASO EN LA INSEMINACIÓN. ESPERE AL MENOS 16 HORAS DESPUÉS DE INICIO DEL CELO ANTES DE APLICAR ESTE PRODUCTO.**

**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:** para largo plazo mantener en el congelador (-4°F / 20° C).

## PRESENTACION

HEIFERPLUS se liofiliza en los siguientes tamaños de envase: Ampolla de 0.25 ml y 0.50 ml.

## ADVERTENCIAS

**MANTENER FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS.**

Fabricado por: EMLAB GENETICS Arcola, IL 61910 USA

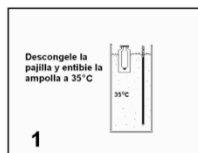
Para obtener más información, llame al 708-442-3964 o visite [www.emlabgenetics.com](http://www.emlabgenetics.com)

HEIFERPLUS® es una marca registrada de EMLAB GENETICS, LLC.

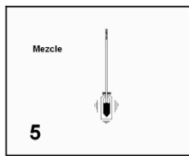
EMLAB GENETICS © 2014

Rev. 03/11/14

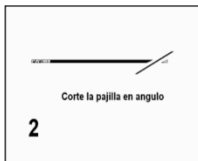
### INSTRUCCIONES DEL KIT



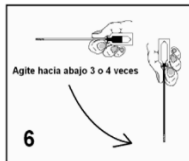
1. Caliente la ampolla a 96-101.5° F (35.6 - 38.6° C) utilizando un baño de agua, calentador de tubo o incubadora durante unos minutos (para evitar el choque frío). Descongele el semen como de costumbre.



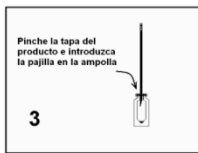
5. Mezclar suavemente el semen con el contenido de la ampolla.



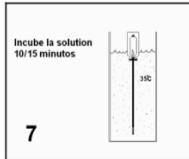
2. Sacar la pajilla del descongelador. Secar, cortar la pajilla a un bisel de 60° con unas tijeras afiladas.



6. Transfiera el semen enriquecido desde la ampolla de vuelta a la pajilla. Haga esto invirtiendo la ampolla y la pajilla, "sacudir" a la baja 3-4 veces. Asegúrese de que todo el semen se encuentre en la pajilla.



3. Punción el sello de la ampolla con aguja 14G e inserte el límite extremo de la pajilla en la ampolla.



7. Incubar el semen en agua (descongelador) durante 10-15 minutos a 96-101.5°F (35.6-38.5° C). Ajustar el tiempo de incubación de acuerdo con la siguiente tabla.

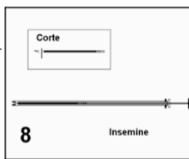
°F	°C	TIEMPO (minutos)
101.5	38.6	10
98.6	37.0	13
96*	35.6	15
90**	32.0	23

\* Preestablecido descongelamiento eléctrico 96° F (35.6° C)

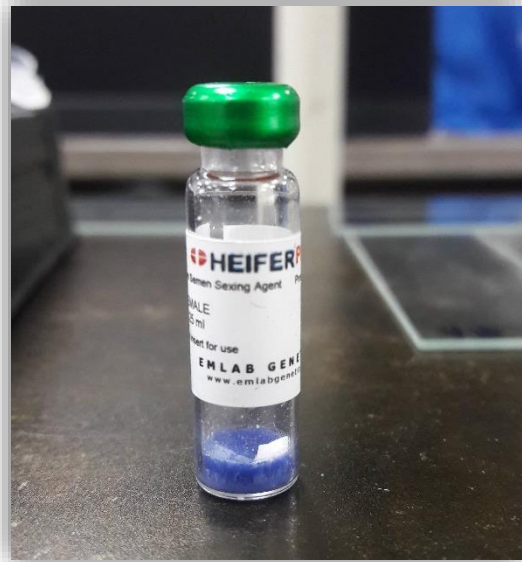
\*\* Descongelamiento no eléctrico



4. Agregue el semen en la ampolla, sujete tanto la ampolla y la pajilla en la palma de la mano y "sacudir" a la baja 3 o 4 veces (similar a sacudir un termómetro de vidrio). Asegúrese que todo el semen entre en la ampolla.



8. Retire la pajilla del agua. Corte el bisel de la pajilla, cargue en la pistola de inseminación e insemine como de costumbre.

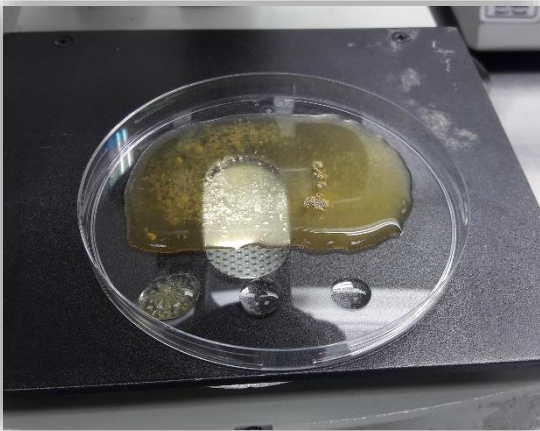


*HeiferPlus™*

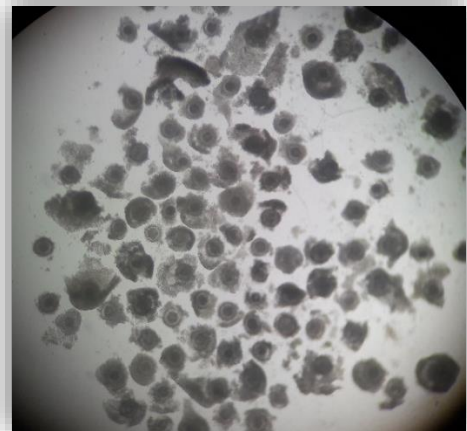
**Anexo 3: Procedimiento en el laboratorio**



**Ovarios obtenidos en el camal**

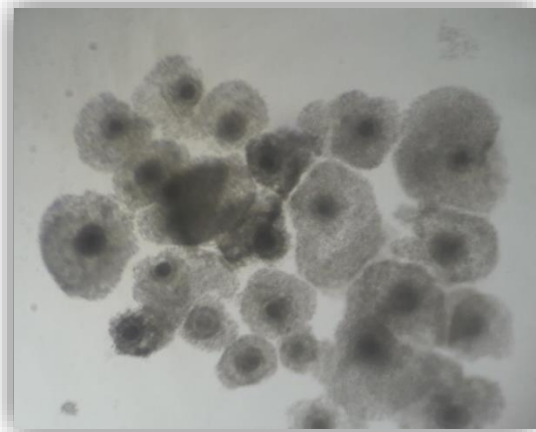
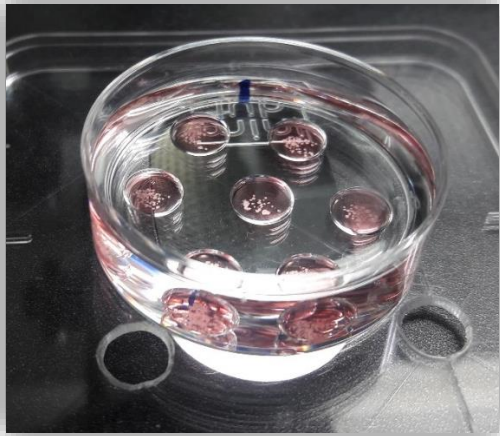


**Búsqueda de COC's en líquido folicular**



**COC's recuperados**

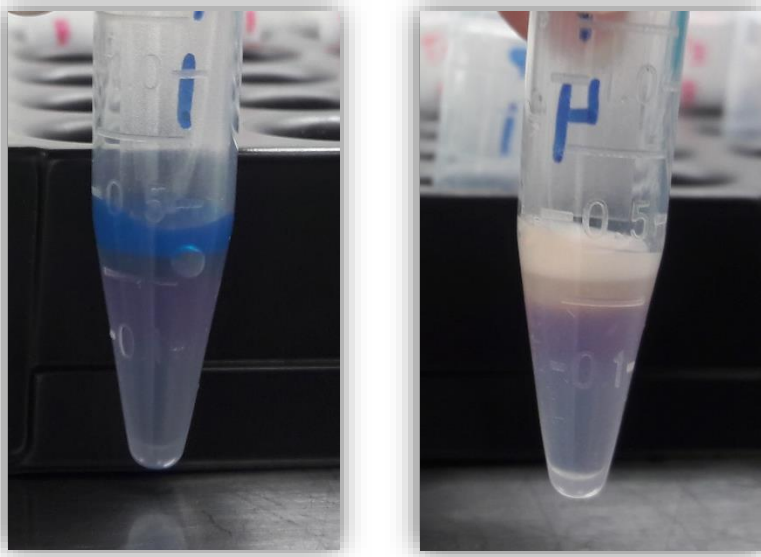




***Maduración ovocitaria***



***Co-incubación del semen con HeiferPlus***



***Selección espermática mediante columnas de Percoll***



***Prueba eosina-nigrosina***

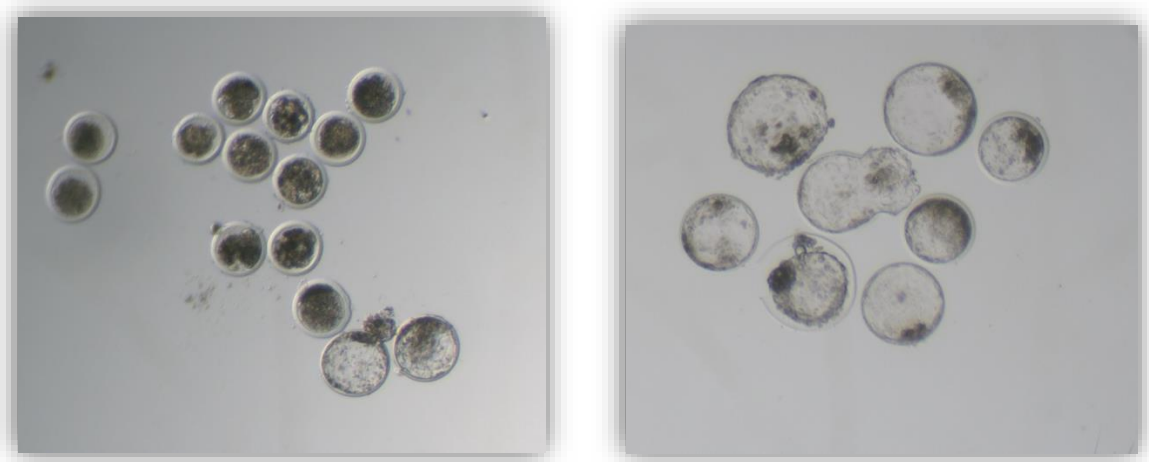


**HOST**

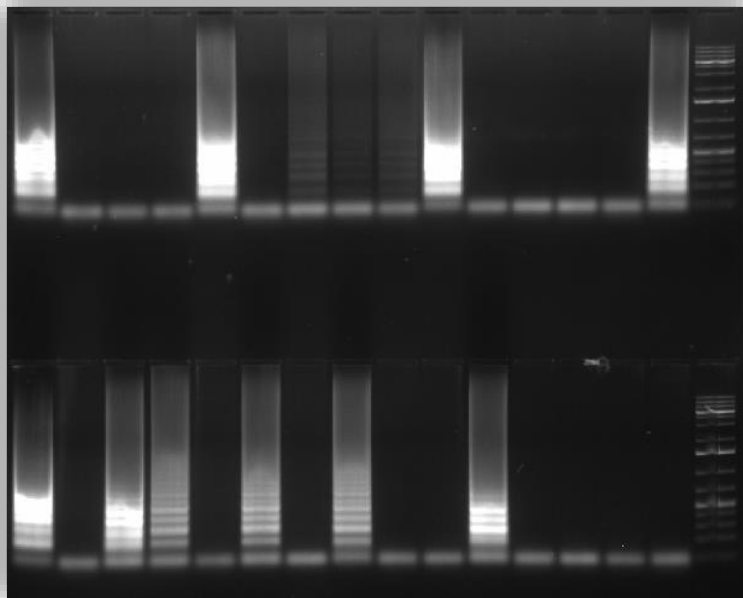


***Integridad de la membrana acrosomal***





***Embriones obtenidos***



***Diagnóstico del sexo de los embriones***