



Uso y evolución del sexado espermático en bovinos. Revisión



Horacio Álvarez Gallardo ^a

David Urbán Duarte ^a

Adriana Velázquez Roque ^b

José Fernando De La Torre Sánchez ^{c*}

^a Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro Nacional de Recursos Genéticos. Blvd. De la Biodiversidad N° 400, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. México.

^b H&A Biotecnologías en Reproducción Animal. Salerno 1836 Frecc. Lomas de San Ángel, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.

^c Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Universidad de Guadalajara, Las Agujas, Zapopan, Jalisco.

* Autor de correspondencia: jose.delatorre@academicos.udg.mx

Resumen:

Desde el inicio comercial del sexado espermático en la inseminación artificial, la adopción de esta tecnología por la industria ganadera (productores, médicos veterinarios y compañías de genética) ha sido una realidad en la producción bovina, principalmente en ganado lechero. La presente revisión, es una descripción de los inicios del sexado espermático, su desarrollo, aplicación a nivel comercial, y evolución hasta la actualidad. Los eventos más significativos fueron sin lugar a dudas la determinación de la diferencia en el contenido de DNA entre los espermatozoides portadores del cromosoma “Y” o “X”, el flujo de estos en el citómetro, y su separación en los así llamados espermatozoides “Y” y “X”. Los siguientes logros que favorecieron la aplicación de esta tecnología de forma comercial fueron la determinación de la concentración óptima y la criopreservación exitosa del semen sexado; desde entonces, las

investigaciones para tratar de disminuir los efectos deletéreos del proceso de sexado no se detuvieron, llegando hasta el surgimiento de nuevas tecnologías de sexado espermático donde este efecto es mínimo. La técnica más ampliamente difundida de forma comercial es el ultrasexado de 4 millones de espermatozoides (SexedULTRA-4M™), en la cual se modificaron completamente el método, los medios y los citómetros, con lo que esta tecnología tiene resultados muy similares a los obtenidos con semen no sexado (semen convencional). Existe otra tecnología de sexado espermático llamada Sexcell™ que se oferta de forma comercial, en la cual han obtenido resultados similares a los obtenidos con semen convencional, pero solo en vaquillas. Con estos avances, el sexado espermático se muestra como una tecnología en constante desarrollo y de alto impacto en la ganadería bovina.

Palabras clave: DNA, Sexado espermático, Cromosomas sexuales, Citometría de flujo.

Recibido: 28/12/2022

Aceptado: 30/05/2024

Introducción

En lo que se refiere a biotecnologías reproductivas en ganado bovino, la pre-selección del sexo tiene una larga historia, en la cual se ha tratado de separar los espermatozoides con cromosomas “X” y “Y” mediante varias técnicas, basándose en principios de diferencia de masa y motilidad, cinética espermática, cambios en la superficie del espermatozoide y diferencias de volumen; sin embargo, ninguno de estos métodos fue capaz (sedimentación, centrifugación y antisuero Y) de producir una separación eficaz de poblaciones de espermatozoides fértiles⁽¹⁾.

La predeterminación del sexo se pudo lograr gracias a los avances en la computación, biofísica, biología celular, fisiología reproductiva aplicada, entre otros. A partir del año de 1980 comenzó a aplicarse una técnica denominada citometría de flujo, la cual permitió separar los espermatozoides de acuerdo con sus cromosomas sexuales. Transcurrieron 20 años para que esta tecnología fuera comercializada para su uso en inseminación artificial (IA) en ganado bovino. Esta técnica se basa en diferenciar los espermatozoides “X” y “Y” en cuanto a su contenido de DNA. En el caso de los bovinos, los espermatozoides “X” que producen hembras contienen un promedio de 3.8 % más DNA que los espermatozoides “Y” que producen machos⁽²⁾. El sexado de espermatozoides por medio de citometría de flujo es una herramienta valiosa que indudablemente tuvo un impacto benéfico en el mejoramiento

genético de la industria ganadera. Esta tecnología, tenía una eficacia en cuanto al nacimiento de crías con el sexo pre-seleccionado, del 85 al 95 %; sin embargo, no estaba completamente perfeccionada⁽³⁾.

La primera producción comercial de semen sexado la realizó la compañía Cogent en el Reino Unido⁽⁴⁾. Aunque tuvo un inicio relativamente lento, aumentó exponencialmente la producción de semen sexado bovino con un estimado de 4 millones de dosis en el 2008⁽⁴⁾. El semen sexado se comercializaba en pajillas de 0.25 ml a una concentración de 2.1 millones de espermatozoides⁽⁵⁾. Se utilizaba una concentración mínima eficiente, debido a que, al momento de sexar el semen, se perdía aproximadamente un 80 % del eyaculado entre los espermatozoides del sexo no deseado y los espermatozoides que no se lograban diferenciar⁽⁶⁾. Este semen era menos fértil y más delicado que el semen convencional, ya que los espermatozoides eran sometidos a varios procesos para la separación de los espermatozoides con cromosoma “X” y los de cromosoma “Y”, además del proceso de congelado y descongelado⁽⁷⁾. A pesar de las limitantes del semen sexado, claramente hubo una buena aceptación⁽⁴⁾. Se consiguieron porcentajes de gestación aceptables con la dosis reducida (2.1 x 10⁶ espermatozoides) de semen sexado en vaquillas, pero se realizaron pocos trabajos con vacas lactantes⁽²⁾. En la actualidad la tecnología del sexado espermático ha evolucionado, modificando las técnicas, incrementando la velocidad del sexado, disminuyendo el estrés, incrementando la concentración espermática y por ende mejorando los parámetros de viabilidad espermática. Al momento existen tres técnicas de sexado que se aplican de forma comercial, todas a través de citometría de flujo; SxedULTRA™⁽⁸⁾ Sexcel™⁽⁹⁾ y Lumisort™⁽¹⁰⁾; sin embargo, existen otras técnicas prometedoras diferentes a la citometría de flujo: sexado espermático por medio de nanopartículas de oro⁽¹⁰⁾ y sexado espermático mediante nanopartículas magnéticas⁽¹¹⁾ pero que aún no se utilizan de forma comercial.

Reseña histórica del sexado espermático

Cuantificación del DNA espermático

Sin lugar a dudas, la determinación del contenido de DNA en el espermatozoide abrió las puertas de la tecnología del sexado espermático. En 1976⁽¹²⁾ se evaluó el contenido de DNA espermático en diferentes especies animales (hámster, ratón, conejo, toro, cerdo, caballo, ostras, abulón y pulpo) mediante citometría de flujo. En este trabajo encontraron que la distribución de las poblaciones dependía de la forma de la cabeza de los espermatozoides y de cómo se orientaban. En el caso de los espermatozoides de abulón (cabezas cilíndricas) presentaron un patrón de fluorescencia simétrico, sin embargo, en el caso de los

espermatozoides de euterios (cabezas alargadas), el patrón de fluorescencia fue asimétrico, lo cual presentaba un problema para aplicaciones de biología reproductiva; sin embargo, los autores llegaron a la conclusión de que este problema se podría solucionar por medio de un flujo plano dada la forma de la cabeza de los espermatozoides (Figura 1).

Figura 1: Morfología y morfometría de la cabeza del espermatozoide en diferentes especies⁽¹³⁾

Dimensiones y perfiles de cabezas de espermatozoides e índices de clasificación citométrica de flujo para algunos mamíferos domésticos y el hombre								
Dimensión	Toro	Borrego	Camero	Conejo	Gato	Perro	Caballo	Hombre
Longitud (µm)	9.1	9.0	8.1	7.7	7.7	7.0	6.5	4.6
Corte sagital de la cabeza								
Ancho (µm)	4.7	5.0	4.0	4.5	3.2	3.5	3.4	3.2
Perfil de la cabeza								
Área (µm ²)	34.5	37.5	26.6	28.0	19.0	20.9	15.2	10.8
Diferencia entre X-Y (%)	3.8	3.6	4.2	3.0	4.2	3.9	3.9	2.8
Índice de clasificación*	131	115	112	84	80	82	59	31

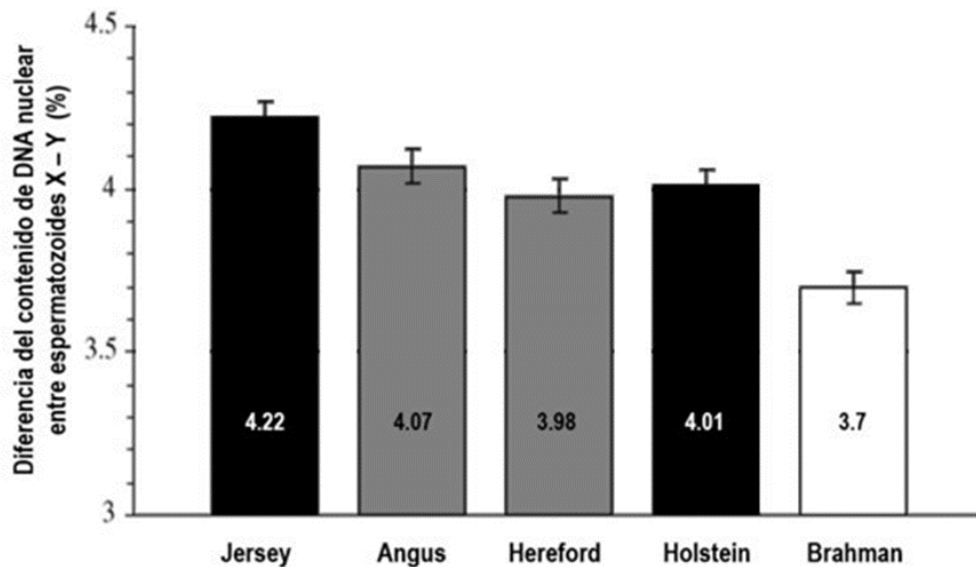
* Una aproximación de la habilidad para la clasificación espermática por citometría de flujo en base al área del perfil de la cabeza (µm²) y la diferencia de DNA entre los espermatozoides X-Y

Cromosomas “X” y “Y” en especies productivas

Dado que a través de la citometría de flujo se abrió la posibilidad de separar los espermatozoides con base a su contenido de DNA, el siguiente paso en el desarrollo de la tecnología de sexado espermático fue la cuantificación del DNA de los espermatozoides “X” y “Y” de especies domésticas. En 1983⁽¹⁴⁾ se evaluó la diferencia en cuanto al contenido de DNA entre los espermatozoides con cromosoma “X” y “Y” de animales domésticos, donde se encontró una diferencia del 3.9 % en el caso de los toros, 3.7 % en los cerdos, 4.1 % en borregos y 3.9 % en conejos. En el caso de los toros, utilizaron 25 toros representando cinco razas (Jersey, Holstein, Hereford, Angus y Brahman) y observaron que el promedio entre la población de espermatozoides con cromosoma “Y” estuvo en un rango del 49.5 al 50.5 % para todas las razas. Las diferencias entre los espermatozoides con cromosoma “X” y “Y” no varió dentro de cada raza, pero fueron significativamente diferentes cuando se compararon

entre razas. La raza Jersey tuvo la mayor diferencia entre cromosoma “X” y “Y” y la raza Brahman tuvo la menor diferencia (Figura 2); esto indica que la raza Jersey es más fácil de sexar que la raza Brahman.

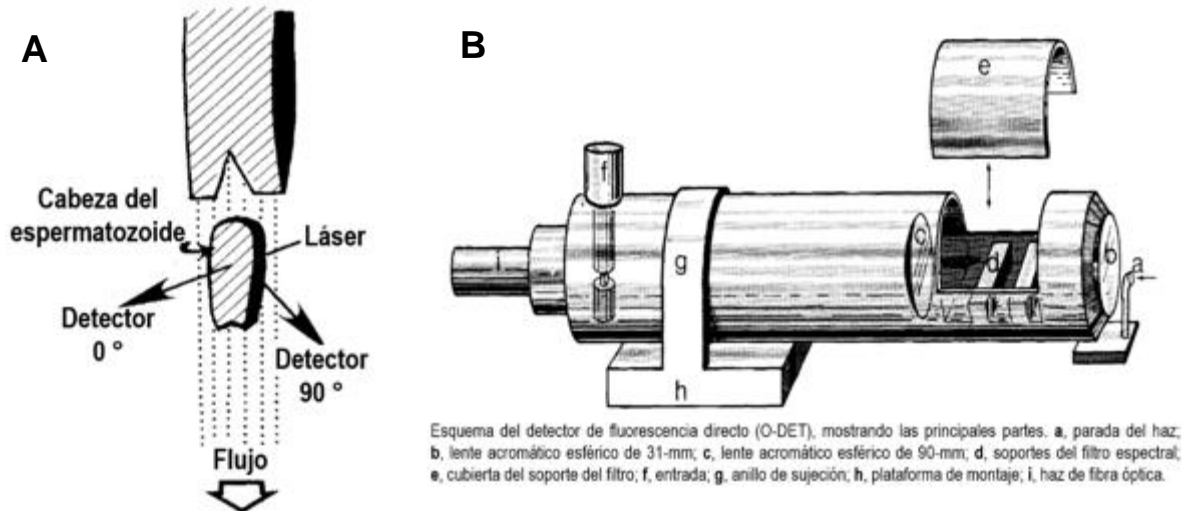
Figura 2: Diferencia entre el contenido de DNA de espermatozoides “X” y “Y” entre diferentes razas bovinas⁽¹³⁾



Primeras modificaciones a los citómetros de flujo para sexado espermático

Una vez que se logró diferenciar a los espermatozoides “X” y “Y” con base en su contenido de DNA, se comenzó a trabajar en el citómetro de flujo para poder hacer lecturas más eficientes. En 1986⁽¹⁵⁾ se realizaron las primeras modificaciones al citómetro de flujo para lograr separar las poblaciones espermáticas. En este trabajo, utilizaron un citómetro EPICS V (Coulter Corporation, FL, USA), al cual le hicieron adaptaciones para mejorar la orientación. Estas adecuaciones consistieron en la modificación del bisel del tubo de inyección de la muestra, además de la adición de un segundo detector de fluorescencia a 90° (Figura 3A), a lo largo del eje del rayo láser, dirigiendo la fluorescencia recogida por un haz de fibras ópticas hacia los tubos fotomultiplicadores (Figura 3B).

Figura 3: Bisel y tubo de inyección utilizado en el citómetro EPICS V. **A.** Punta biselada y detectores de fluorescencia. **B.** Tubos fotomultiplicadores⁽¹⁵⁾



Posteriormente se continuó con las modificaciones del tubo de inyección de la muestra, haciendo una punta biselada. Esta punta biselada (25°) provocó un flujo de muestra de una forma plana, así la fuerza hidrodinámica en los núcleos de los espermatozoides hizo que se orientaran preferentemente en el plano del flujo. Los núcleos teñidos con fluorocromos eran excitados por un rayo láser perpendicular al plano del flujo de la muestra. El láser incidía el lado plano de los núcleos de los espermatozoides orientados y la fluorescencia era detectada simultáneamente desde el lado plano por un detector de fluorescencia a 0° , además se agregó un detector estándar a 90° . Para generar la fluorescencia se utilizó un láser Coherent Innova 90-5 Argón-ion (Coherent Inc, CA, USA), operando en luz ultravioleta (351, 364 nm) a 150-200 mW de poder. La fluorescencia emitida individualmente por cada núcleo espermático era colectada por ambos detectores (0° y 90°) y almacenada como distribuciones de frecuencia (histogramas) en un sistema de pantalla de adquisición de datos multiparamétricos. El proceso de separación se llevó a cabo mediante la formación de gotas mediante un flujo de caída mediante vibración ultrasónica. Cada gota contenía un núcleo espermático el cual emitía fluorescencia, la cual era detectada y cargada electrostáticamente en uno de los dos contenedores para cada población “X” o “Y”. Con estas modificaciones y trabajando con espermatozoides de chinchilla, se logró que los núcleos de los espermatozoides fueran separados en “X” y “Y” a una velocidad de 55 núcleos/seg para cada población, con una pureza del 95 %⁽¹⁶⁾.

Progenie obtenida a partir de espermatozoides con cromosoma “X” y “Y”

Hasta este momento solo se había trabajado con técnicas invasivas tanto para la tinción como para la selección de los espermatozoides con cromosoma “X” y “Y”, por lo cual el siguiente paso sería la selección de espermatozoides viables con los cuales se pudiera hacer IA.

En 1989⁽¹⁷⁾ se llevó a cabo la primera prueba de IA utilizando espermatozoides sexados en conejas. Para esta prueba se empleó semen fresco de dos conejos, el cual fue sexado en un citómetro de flujo EPICS V con las modificaciones previas^(15,16). En esta prueba se obtuvieron poblaciones espermáticas con cromosoma “X” con una pureza del 86 % y 81 % para los espermatozoides con cromosoma “Y”. Con el semen obtenido se realizaron inseminaciones quirúrgicas en hembras previamente sincronizadas, con semen no sexado, con semen con cromosoma “X” y con semen con cromosoma “Y”. De las hembras inseminadas con semen con cromosoma “X”, 94 % de las crías fueron hembras; para el caso de las hembras inseminadas con semen con cromosoma “Y”, 81 % de las crías fueron machos. Este trabajo demostró la precisión de la técnica de sexado espermático por medio de citometría de flujo.

Posteriormente se reportaron las primeras crías bovinas nacidas a partir de embriones producidos *in vitro* con semen sexado, el cual tuvo una pureza del 79 % para los espermatozoides con cromosoma “X” y 70 % para cromosoma “Y”. Los embriones producidos *in vitro*, fueron sexados mediante PCR; el análisis indicó que el 73 % fueron hembras y el 69 % fueron machos, sin que hubiera diferencia estadísticamente significativa con respecto a lo obtenido en el análisis por citometría de flujo. En esta investigación se observó que el semen sexado continuaba teniendo su capacidad fertilizante y que tenía una pureza aceptable, sin embargo, la cantidad de espermatozoides seleccionados era muy baja para ser utilizada en IA, pero sí era factible de ser utilizada para la producción *in vitro* de embriones (PIV)⁽¹⁸⁾.

En 1996⁽¹⁹⁾, se realizó una prueba de campo en la que se inseminaron (inseminación profunda, ipsilateral al ovario con folículo de mayor tamaño) vaquillas Holstein con semen sexado (pureza de 90 %, 1×10^5 espermatozoides) refrigerado a 5°C. En este trabajo pasaron aproximadamente 18 h desde que se recolectó el semen hasta que se inseminó a las vaquillas. Se realizaron 22 inseminaciones, de las cuales 11 hembras se diagnosticaron gestantes a los 60 días, de dichas gestaciones, se determinó el sexo por medio de ultrasonografía (entre los 60 y 70 días gestación), uno de los 11 fetos no fue del sexo predicho.

Creación de la compañía XY Inc.

Los resultados obtenidos en la prueba de IA en bovinos⁽¹⁹⁾, alentaron a que el USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América) concediera la licencia a la Fundación de Investigación de la Universidad Estatal de Colorado (CSURF), Fort Collins, CO, USA para proceder con la comercialización de la tecnología Beltsville de sexado espermático para la selección del sexo en espermatozoides mamíferos no humanos. Con la emisión de esta licencia en 1996, se formó la compañía XY Inc., la cual fue una colaboración entre la CSURF, Cytomation Inc. (CO, USA) e inversionistas privados. Esta compañía adquirió los derechos de la citometría de flujo de alta velocidad y la comercializó como el citómetro MoFlow™ (CO, USA). Este citómetro incluía las modificaciones realizadas en la aguja de inyección^(15,16) y fue mejorado con la adición de una boquilla de selección que orientaba el 70 % de los espermatozoides mediante la presión del sistema de fluido hidrostático. Con esta mejora se podían analizar alrededor de 20,000 espermatozoides/seg y clasificar hasta 6,000 o más espermatozoides/seg de cada una de las poblaciones “X” o “Y” con un 90 % de precisión. En 2003 Cytomation Inc., fue comprada por la compañía danesa de biotecnología Dako, convirtiéndose en Dako A/S, la compañía siguió produciendo el citómetro para sexado espermático al que renombraron como MoFlow SX™ (CO, USA). Posteriormente la división de instrumentación de citometría de flujo fue adquirida por Beckman Coulter ubicada en Fullerton, CA, USA⁽⁵⁾.

Inseminación artificial con dosis baja de semen sexado

En 1997 se realizó una investigación con dos objetivos: 1) evaluar los porcentajes de gestación de vaquillas sincronizadas e inseminadas (en el cuerno uterino, ipsilateral al ovario con folículo de mayor tamaño) con dosis muy reducidas de semen (1×10^5 ; 2.5×10^5 ; 2.5×10^6 espermatozoides/0.21 ml) refrigerado a 5 °C bajo condiciones ideales a nivel de campo; 2) evaluar los porcentajes de gestación de vaquillas sincronizadas e inseminadas (en el cuerno uterino, ipsilateral al ovario con folículo de mayor tamaño) con dosis bajas de semen sexado ($1-2 \times 10^5$ espermatozoides/0.1 ml) refrigerado a 5 °C. En el primer experimento los porcentajes de gestación a los 40 días fueron del 41 %, 50 % y 61 % para 1×10^5 ; 2.5×10^5 ; 2.5×10^6 espermatozoides/inseminación, respectivamente. En el segundo experimento, de 67 vaquillas inseminadas el 22 % resultaron gestantes y el 82 % de las crías fueron del sexo seleccionado⁽²⁰⁾.

Criopreservación exitosa del semen sexado

Posteriormente en 1999, se llevó a cabo otra investigación con el objetivo de poder evaluar el proceso de congelación del semen sexado; esto se pudo realizar debido a que el semen fue procesado en un citómetro de flujo MoFlow SX™, con lo cual se pudo tener suficiente cantidad de espermatozoides a diferencia de cuando se trabajó con el citómetro de flujo EPICS V. En este trabajo se determinó que el uso del láser a una potencia de 100 mW tenía un menor impacto sobre la motilidad progresiva del semen post-descongelado que cuando se utilizó a 150 mW. También se observó que la motilidad progresiva post-descongelado fue superior cuando se utilizó un diluyente en base a TRIS que cuando se utilizó citrato-yema de huevo o TEST. En cuanto al tiempo de equilibrio a 5 °C previo a la congelación, se concluyó que fue mejor la motilidad progresiva post-descongelado de 3 a 6 h que cuando duró 18 h. Por otra parte, se determinó que fue mejor mantener el semen crudo (semen recién colectado, sin diluir) a 22 °C que diluirlo con el medio TALP adicionado con el fluorocromo Hoechst 33342 (ICN Biomedicals Inc., OH USA). Con estos nuevos procedimientos para el sexado espermático se consiguieron resultados ligeramente menores que con semen convencional en cuanto a motilidad e integridad acrosomal, y se consideró que el uso de semen sexado para inseminación artificial de forma comercial estaría disponible en aproximadamente 2 años⁽²¹⁾.

Inicios de la comercialización del semen sexado

La compañía Monsanto ubicada en St, Louis, Mo, USA, desarrolló un sistema de selección espermática único en su clase, el cual utilizaba 16 boquillas de selección en vez de una sola como en el caso de los citómetros MoFlow SX™. Este equipo se pretendía comercializar, pero al parecer debido a problemas con bajos porcentajes de concepción que se detectaron en sus primeras pruebas, la compañía desistió⁽⁵⁾. En 2003, Genetic Resources International / Sexing Technologies en Navazota TX, USA compró la propiedad intelectual y el equipo de sexado espermático desarrollado por Monsanto y toda la infraestructura de XY Inc⁽⁵⁾. Actualmente la compañía cambió su nombre a STgenetics®⁽²²⁾.

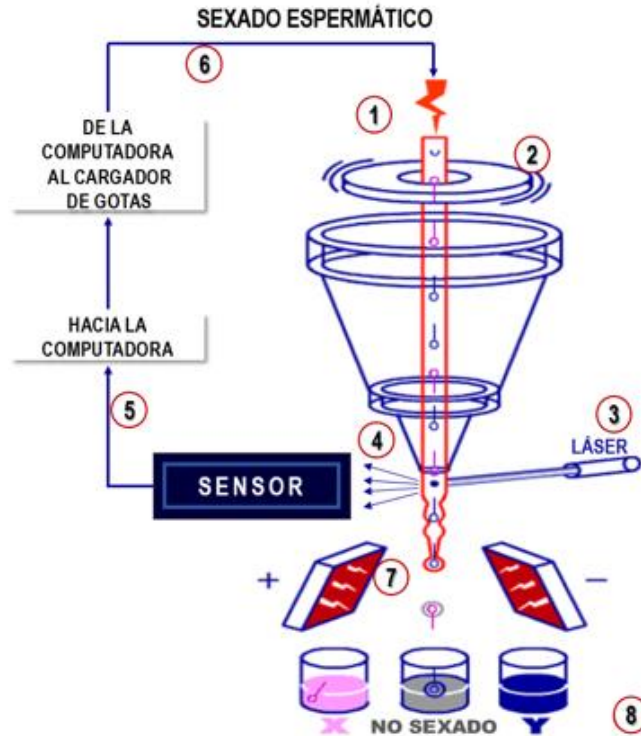
Sexado espermático con la técnica convencional (Legacy o XY)

Aspectos generales del sexado espermático Legacy

El sistema de sexado espermático Legacy usaba un citómetro de flujo MoFlow SX™, el cual consistía en un circuito cerrado de alta velocidad de flujo de líquidos, que permitía alinear y leer los espermatozoides individualmente en microgotas. La fluorescencia que producía cada

espermatozoide teñido era procesada por un software que permitía al operador seleccionar la población espermática con mínima y máxima luminosidad según el sexo que se quería separar. Los espermatozoides elegidos eran cargados eléctricamente, desviados del flujo original en un campo magnético y finalmente recolectados⁽⁶⁾ (Figura 4). Después se concentraban mediante centrifugación y posteriormente eran congelados, quedando vivos solo la mitad del total⁽⁴⁾.

Figura 4: Sistema de clasificación de espermatozoides por citometría de flujo



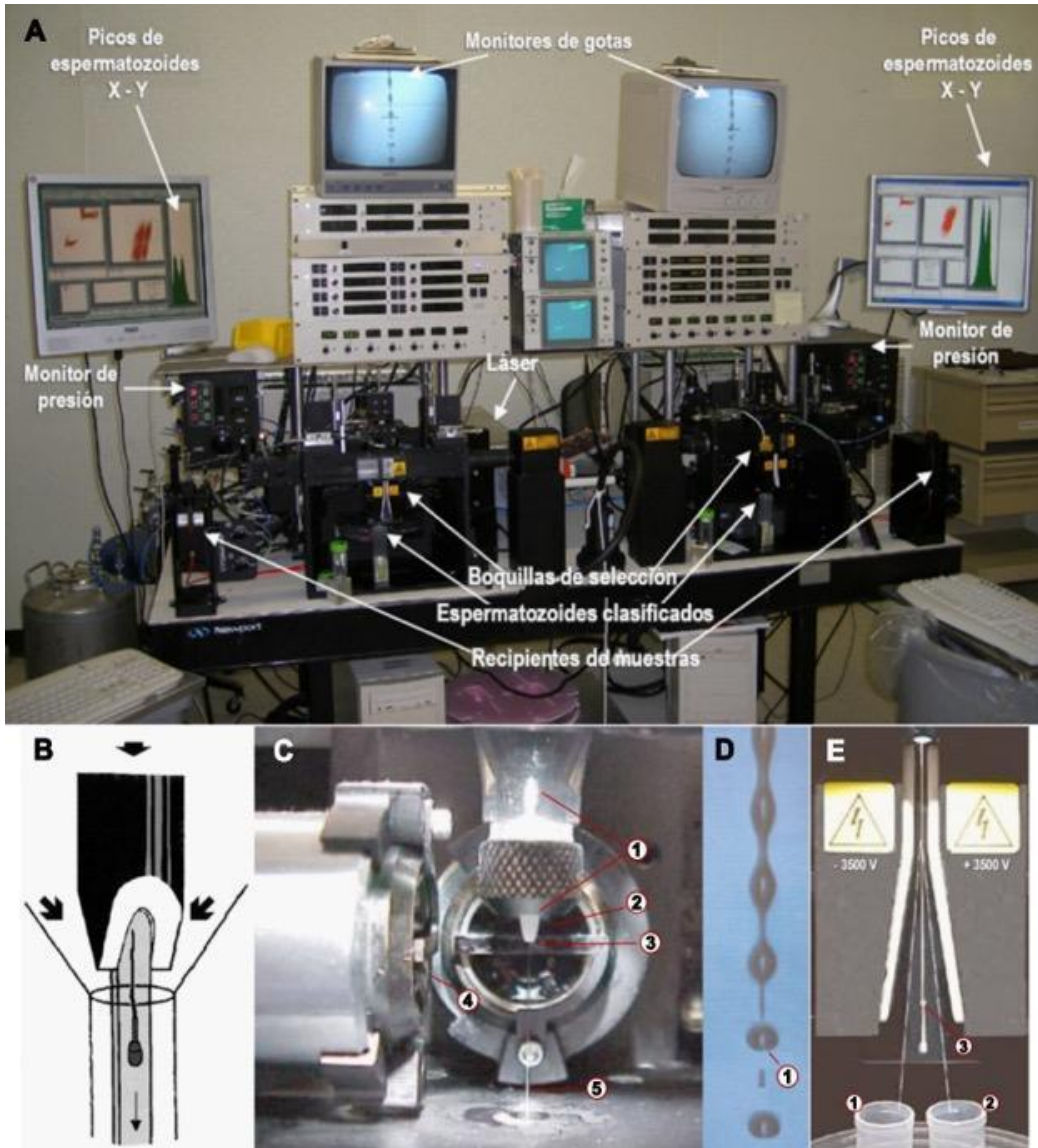
1) Los espermatozoides se inyectan a través del sistema después de haber sido teñidos con un fluorocromo de unión al DNA, 2) Un anillo vibratorio de cristal piezoeléctrico hace que se formen 90,000 gotas por segundo a medida que la corriente sale del sistema, 3) Un láser UV ilumina los espermatozoides mientras fluyen por el rayo, 4) Los espermatozoides X fluorescen con 4 % más intensidad que los espermatozoides Y, 5) La señal detectada con un tubo fotomultiplicador, es enviada a una computadora que procesa la fluorescencia detectada y categoriza si el espermatozoide es X, Y o no orientado, 6) Negativo, positivo o sin carga, se aplica a las gotas que emergen del flujo, 7) A medida que las gotas cargadas pasan entre placas cargadas continuamente, éstas se desvían, 8) Los espermatozoides son colectados en tres contenedores: X, Y, no orientado o sin espermatozoide⁽²⁾.

La calidad y concentración espermática de los eyaculados eran quizás los factores más importantes para obtener una buena separación de las dos poblaciones, ya que se demostró una alta correlación entre la motilidad, la concentración y la separación de las poblaciones con citómetros de flujo de alta velocidad. Por lo tanto, la separación de espermatozoides “X”

y “Y” se llevaba a cabo normalmente en eyaculados con más del 50 % de motilidad progresiva y 75 % de espermatozoides normales⁽⁶⁾.

Con los citómetros de alta velocidad, los MoFlo SX™ (Figura 5), los espermatozoides pasaban por el citómetro a una velocidad de 80 km/h, aproximadamente 20,000 espermatozoides totales/segundo⁽³⁾ y se requería de 9 min para sexar una pajilla de 2×10^6 espermatozoides, aproximadamente siete pajillas por hora⁽⁵⁾.

Figura 5: Citómetro MoFlow SX™ para sexado espermático XY



A. Clasificador de espermatozoides y computadora. **B.** Punta biselada. **C.** Óptica de hidrodinámica, 1) Boquilla con punta orientadora X Y, 2) Objetivo de fluorescencia lateral: orientación celular, 3) Barra de bloqueo, 4) Objetivo de fluorescencia frontal: cuantificador de DNA celular, 5) Salida de flujo. **D.** Formación de microgotas, 1) Última gota unida. **E.** Placas de deflexión, 1) Espermatozoides con cromosoma Y, 2) Espermatozoides con cromosoma X, 3) Corriente residual^(1,2,5).

En el proceso de sexado, aproximadamente del 100 % de los espermatozoides, un 20 % terminaba colectado en la fracción “X” y un 20 % en la fracción “Y”; el 60 % restante lo constituían espermatozoides que no pudieron ser detectados por el citómetro, espermatozoides muertos y gotas sin espermatozoides^(3,6).

Las características espermáticas y supervivencia del espermatozoide sexado eran pobres comparadas con el espermatozoide no sexado (el incremento de espermatozoides muertos alcanzaba el 18.6 %); esto se atribuía al proceso de sexado⁽⁷⁾ que iniciaba con muchas horas de mantenimiento desde la recolección del semen hasta que el semen era sexado⁽¹⁾.

Factores que afectan los resultados del semen sexado Legacy en la IA

Viabilidad

El daño debido al proceso de sexado con la técnica Legacy repercutía directamente en los porcentajes de gestación. La menor fertilidad del semen sexado se debía principalmente a la exposición a fuerzas mecánicas durante el proceso de sexado, y en menor grado a la tinción y exposición al láser⁽³⁾. Después del proceso de sexado, los espermatozoides eran parcialmente capacitados, disminuyendo la vida útil y por consiguiente la fertilidad se reducía⁽²³⁾. Por todo lo mencionado, las pajillas tenían un mínimo de 35 % de espermatozoides con motilidad progresiva y mínimo 85 % de certeza del sexo para alcanzar los estándares de aprobación⁽⁶⁾.

Concentración

Además del daño causado por el proceso de sexado, otra de las causas de la disminución en la fertilidad del semen sexado Legacy se debía al bajo número de espermatozoides que contiene la dosis^(6,24). Una dosis de 2.1 millones de espermatozoides es una dosis baja para IA⁽²⁵⁾; sin embargo, se observó que para la mayoría de los toros la concentración de espermatozoides para obtener un porcentaje del 80 % de concepción normal es aproximadamente de 2 millones de espermatozoides por dosis⁽²³⁾. En vacas inseminadas (12 h después del celo natural) con dosis de 2 millones de espermatozoides de semen sexado y convencional los porcentajes de gestación fueron menores al 30 % y no difirieron entre el semen sexado y el convencional, indicando que el número total de espermatozoides inseminados parece tener un mayor impacto sobre la concepción que el uso de semen sexado

o convencional⁽²³⁾. Por otra parte, no se encontró diferencia ($P=0.64$) al inseminar (12 h después del celo natural) vacas Holstein con 2.1 y 3.5 millones de espermatozoides sexados obteniendo porcentajes de 23 % y 25 % respectivamente⁽²⁶⁾. Sin embargo, bajo condiciones ideales de inseminación, y con dosis de 3 millones de espermatozoides sexados en vacas de carne en lactación, los porcentajes de gestación fueron similares a los de vaquillas⁽²⁷⁾. En otro estudio se encontró que los porcentajes de gestación fueron virtualmente idénticos con 1, 1.5 y 3 millones de espermatozoides por dosis (54 %, 56 % y 51 %, respectivamente)⁽²⁸⁾. Con base en los trabajos realizados, se puede ver que la baja concentración espermática de las dosis de semen sexado era suficiente para obtener porcentajes adecuados de gestación.

Diferencias entre toros

Se han reportado diferencias entre toros respecto a la tolerancia de los espermatozoides al proceso de sexado^(3,27). Además, se encontró una diferencia de hasta el 18 % de gestación de acuerdo al toro utilizado^(23,27), lo que indica que la fertilidad del semen sexado parece diferir entre toros. Esto implica que la fertilidad del semen sexado no puede ser predicha de forma precisa por medio de pruebas de campo como con semen convencional⁽²⁴⁾. Por lo tanto, se debe tener cuidado al interpretar los resultados obtenidos con el semen sexado, ya que existe una fuerte influencia del toro utilizado con los porcentajes de gestación⁽²³⁾. De esta manera, el monitoreo de resultados de semen sexado y mantenimiento de los toros (Holstein) con la más alta fertilidad para el sexado es la mejor manera para incrementar la fertilidad del mismo⁽²⁴⁾.

Otras aplicaciones del semen sexado Legacy

Semen sexado reverso

El sexado espermático reverso (RSS), o también conocido como semen revertido, es una técnica que permite obtener espermatozoides con cromosoma “X” y “Y” a partir de semen congelado de manera convencional. Una ventaja de esta tecnología es el poder obtener semen sexado de toros de alto mérito genético que hayan muerto⁽²⁹⁾. El RSS se ha asociado a otras biotecnologías como la IA⁽³⁰⁾ y la PIV⁽³¹⁾. En pruebas realizadas con IA, los porcentajes de gestación fueron bajos, del 4 a 10%⁽³⁰⁾, con 14.2 % de crías nacidas⁽³²⁾. Por lo mencionado, el principal uso de esta tecnología es con la PIV⁽²⁹⁾.

Producción *in vivo* de embriones con semen sexado Legacy

El uso del semen sexado Legacy para la ovulación múltiple de donadoras ha tenido resultados muy variables, generalmente malos o muy bajos con respecto al semen convencional, donde se reportan entre 1.4⁽³³⁾ y 2.3s embriones transferibles⁽³⁴⁾ por recolecta. Algunos resultados prometedores utilizando vaquillas reportan que no hay diferencia significativa entre semen sexado y convencional⁽³⁵⁾. Por todo lo anterior, el uso de semen sexado Legacy en programas de ovulación múltiple se ha visto limitado.

Producción *in vitro* de embriones con semen sexado Legacy

Históricamente siempre se ha considerado que el método más económico de usar el semen sexado en programas de reproducción en ganado bovino es a través de la PIV, ya que con esta biotecnología reproductiva se requiere una cantidad muy pequeña de espermatozoides. Combinada con la aspiración folicular guiada por ultrasonido, se obtienen grandes cantidades de embriones generados tanto de espermatozoides “X” como “Y”. Muchos estudios se han realizado utilizando semen sexado Legacy para producir embriones *in vitro*, y se han descrito muchos aspectos relacionados con la producción *in vitro* de embriones bovinos con este semen, entre estos se encuentran las bajas tasas de fertilización, de divisiones, de producción de blastocistos, de gestación y la variación entre toros⁽³⁶⁾. Al evaluar el semen sexado fresco comparado con semen convencional fresco y semen sexado congelado comparado con semen convencional congelado para PIV, se encontró que en el caso del semen fresco los resultados parecían ser similares en cuanto a parámetros de motilidad, sin embargo, en el porcentaje de divisiones fueron menores ($P < 0.001$) para el semen sexado fresco con respecto al semen convencional fresco (66 vs 76 %, respectivamente). Al utilizar semen sexado congelado y semen convencional congelado, no tuvieron diferencias en el porcentaje de divisiones. Otro aspecto observado con el semen sexado fue que hubo un retraso de medio a un día en el desarrollo al estadio de blastocisto. Estos autores encontraron que la producción de blastocistos con semen sexado fue ~30 % menor comparado con semen convencional⁽³⁷⁾. En otro estudio se reportó que el porcentaje de producción de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos colectados por aspiración folicular guiada por ultrasonido fue menor ($P < 0.05$) cuando se utilizó semen sexado comparado con semen convencional⁽³⁸⁾. En general la producción de blastocistos con semen convencional es de alrededor del 30 al 40 % y del 10 al 20 % con semen sexado⁽³⁶⁾.

Por otra parte, en el caso de la PIV con RSS no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.1$) entre el porcentaje de blastocistos obtenidos utilizando semen sexado y RSS^(31,39). De forma comercial en razas *Bos taurus* y *Bos indicus*, el uso de RSS para la PIV

tuvo un porcentaje promedio del 30 % de producción de blastocistos⁽²⁹⁾. Un aspecto relevante es que se ha encontrado que las crías producidas a partir de PIV con RSS presentan significativamente mayores pesos al nacimiento ($P=0.028$), mayor crecimiento postnatal ($P=0.001$), mayores porcentajes de mortalidad (en los primeros 6 meses de edad; $P=0.008$) y reducción en la producción de leche ($P=0.001$), grasa ($P=0.007$) y proteína ($P=0.031$), con respecto a las crías nacidas a partir de IA⁽⁴⁰⁾.

Semen sexado SexedULTRA™

Aspectos generales de la técnica

Las causas de una menor fertilidad del semen sexado se han atribuido a los diversos cambios bioquímicos a los que son sometidos los espermatozoides durante el proceso de sexado. Existen alrededor de 20 diferentes subprocesos involucrados en el sexado espermático, entre los más críticos e importantes se encuentran el tiempo de mantenimiento antes de realizar la tinción, exposición al láser para generar fluorescencia y lograr la separación entre espermatozoides (con cromosomas “X” y “Y”) y por último la exposición a un campo eléctrico para la separación de poblaciones relativamente puras en un contenedor^(1,3,13). De acuerdo con lo mencionado, el desafío era buscar nuevas formas de controlar estos eventos utilizando nuevos hardware, software, además de nuevas técnicas de procesamiento durante, antes y después de las etapas de separación espermática⁽¹³⁾.

La tecnología Legacy o XY descrita en previas publicaciones^(41,21) ha sido modificada y ahora cambió a un totalmente nuevo sistema de sexado llamado ultralsexado o por su marca, SexedULTRA™ (Navazota, TX, USA). La tecnología de ultralsexado se ha diseñado para ser menos agresiva para el espermatozoide durante los puntos más críticos del proceso, mejorando particularmente los cambios de pH (sistema buffer) y estrés oxidativo⁽⁴²⁾.

Modificaciones a la técnica

Aunque en la actualidad existen muy pocos datos acerca de esta nueva tecnología (debido a cuestiones de propiedad intelectual), se ha reportado que, en esta nueva técnica, se alteró la fisiología espermática para facilitar el ingreso del fluorocromo Hoechst 33342 y para retenerlo dentro de la célula, lo que permite que haya mayor fluorescencia y con esto se logre una mejor discriminación entre las poblaciones “X” y “Y”. Por otra parte, el proceso de

criopreservación es otro paso muy estresante para la célula espermática, por lo cual, la tecnología SexedULTRA™ se ideó para simplificar y optimizar los medios y controlar estos agentes estresores para el espermatozoide. Se modificó el protocolo, con un tratamiento previo al proceso de tinción, además del uso de un nuevo medio de tinción que mantiene el pH estable durante un periodo de tiempo más prolongado. El medio de congelamiento también fue modificado, tomando en cuenta la dosis de semen sexado⁽⁴²⁾.

En el éxito del proceso de ultralsexado influyeron principalmente dos factores: las modificaciones en los medios y los equipos para realizar el sexado. Los citómetros MoFlo SX™ (Cytomation Inc, Fort Collins, CO, USA) eran equipos muy costosos, voluminosos, tenían bajo rendimiento y requerían de personal altamente capacitado para operarlos (Figura 4). Los modernos citómetros Genesis desarrollados por Cytonome ST™ (Boston, MA, USA) tienen características electrónicas avanzadas y automatizadas con múltiples cabezas en una máquina para una separación paralela. El citómetro Genesis III™ (Figura 6), utiliza un láser de estado sólido, dos detectores ortogonales (0° y 90° con respecto al laser), una boquilla de orientación y una separación de subpoblaciones de ~8000 espermatozoides/segundo con ~90% de pureza, alcanzando un máximo de separación de 500 millones de espermatozoides/hora⁽⁴²⁾.

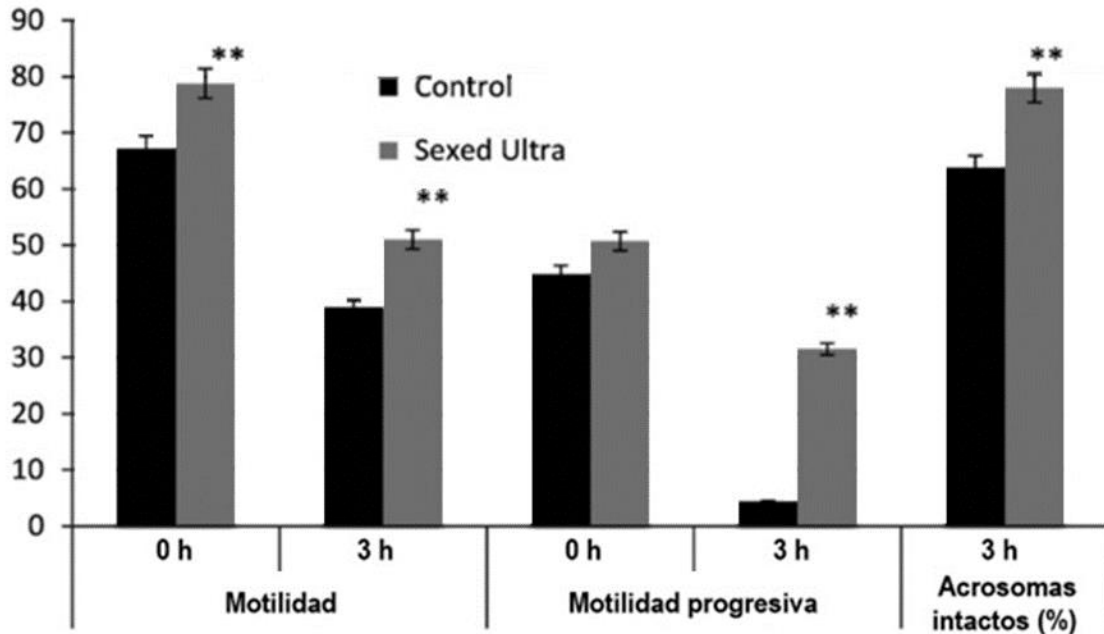
Figura 6: Citómetro Genesis III™ para sexado espermático⁽⁴²⁾



Pruebas de laboratorio de la tecnología SexedULTRA™

Con estos cambios, en las pruebas de laboratorio, se incrementó la motilidad espermática, así como la integridad del acrosoma con respecto a la tecnología XY Legacy (sexado convencional) considerando las mismas concentraciones espermáticas (Figura 7)⁽⁸⁾.

Figura 7: Comparación de los métodos de sexado SexedULTRA™ y XY Legacy (Testigo) sobre la evaluación de calidad *in vitro* de semen



La motilidad espermática y la motilidad progresiva fueron evaluadas usando evaluación de semen asistida por computadora y el porcentaje de acrosomas intactos fue determinado mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (n=12 toros). Barras con dos asteriscos difieren significativamente ($P < 0.001$)⁽⁸⁾.

Además, en pruebas de fertilización *in vitro*, el semen ultrasegado tuvo mayor número de embriones congelables comparado con el semen sexado Legacy con un 13.2 % y 9 %, respectivamente⁽⁸⁾.

Por otra parte, en 2018⁽⁴³⁾, se evaluó la calidad espermática considerando, integridad de la membrana plasmática, porcentaje de acrosomas intactos e índice de fragmentación del DNA (DFI) del semen SexedULTRA™ comparado con el semen convencional. En el semen SexedULTRA™ a las 3 h post-descongelado, el porcentaje de acrosomas intactos fue significativamente mayor con respecto al semen convencional (Cuadro 1). En cuanto al DFI, el semen SexedULTRA™ tuvo un DFI significativamente menor en todos los puntos de evaluación con respecto al semen convencional. Los autores concluyen que la tecnología SexedULTRA™ mantiene la calidad del semen y en muchos casos tiene mayor longevidad *in vitro* comparado con el semen convencional.

Cuadro 1: Comparación de características de semen SexedULTRA™ y semen convencional congelado-descongelado

Valor	Tiempo	Medias mínimo cuadráticas		Tukey		
		Convencional	SexedULTRA™	Diferencia de medias	EE	<i>P</i>
Motilidad visual	0 h	61.0	63.8	2.8	2.4	0.250
	3 h	50.1	51.0	0.9	2.4	0.709
Motilidad total	0 h	60.6	63.8	3.2	2.2	0.157
	3 h	49.6	50.0	0.4	2.2	0.862
Motilidad progresiva	0 h	49.8	53.0	3.3	2.5	0.198
	3 h	28.5	29.4	1.0	2.5	0.698
Membrana plasmática intacta	0 h	55.6	56.7	1.1	1.6	0.502
	3 h	40.7	43.4	2.6	1.6	0.121
Acrosomas intactos	0 h	72.6	76.0	3.3	2.1	0.126
	3 h	55.6	62.3	6.7	2.1	0.004

EE= error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor $P < 0.05$ (Valores subrayados y en negritas), $n=10^{(43)}$.

Evaluación y estandarización de la tecnología SexedULTRA™ en campo

En la primera evaluación a nivel de campo utilizando la tecnología SexedULTRA™ para IA (Cuadro 2)^(44,45), hubo un incremento del 7.4 % en las tasas de concepción de vaquillas con respecto a la tecnología XY Legacy. La segunda prueba se realizó en colaboración con la compañía comercial Select Sires (OH, USA); en esta prueba se utilizaron ocho toros Holstein de los cuales se recolectó semen y se procesó utilizando tanto la tecnología SexedULTRA™ como la tecnología XY Legacy, con lo que se inseminaron 6,930 vaquillas. Los resultados mostraron que el semen SexedULTRA™ incrementó 4.5 % ($P < 0.001$) la tasa de concepción con respecto al semen XY Legacy (46.1 y 41.6 %, respectivamente)^(44,45).

Cuadro 2: Resultados de pruebas de fertilidad en campo de vaquillas inseminadas con semen SexedULTRA™^(44,45)

	Número de inseminaciones	Porcentaje de concepción
Prueba Sexing Technologies		
XY Legacy	1,166	47.3 ^a
SexedULTRA™	957	54.7 ^b
Diferencia de medias		7.4
Prueba Select Sires		
XY Legacy	3,384	41.6 ^a
SexedULTRA™	3,546	46.1 ^b
Diferencia de medias		4.5

^{ab} Dentro de la prueba, filas con diferentes superíndices difieren ($P < 0.01$).

Con estas pruebas se observó que los efectos deletéreos de la tecnología XY Legacy fueron parcialmente aminorados con la nueva tecnología SexedULTRA™, por lo que el siguiente paso lógico fue incrementar la concentración espermática por dosis, aunque en el pasado el aumento en la concentración espermática no mejoró la fertilidad. La siguiente prueba se realizó en colaboración con la compañía German Genetics International, para lo cual utilizaron cinco toros Holstein a los cuales se les recolectó semen, y cada eyaculado se dividió en cuatro partes para ser procesado con la tecnología XY Legacy de 2.1 millones de espermatozoides, SexedULTRA™ de 2.1, 3 y 4 millones de espermatozoides por dosis; además se utilizó semen de estos mismos toros de eyaculados contemporáneos congelados de forma convencional, con una concentración de 15 millones de espermatozoides por dosis. Se calcularon las tasas de no retorno al estro a 65 días a partir de 7,855 inseminaciones con semen sexado y 62,398 inseminaciones con semen convencional. En general el semen XY Legacy de 2.1 millones de espermatozoides por dosis resultó en menores tasas de no retorno al estro comparado con todos los tratamientos de SexedULTRA™ y semen convencional. Los tratamientos de SexedULTRA™ de 2.1 y 3 millones de espermatozoides por dosis fueron similares, pero menores que el semen convencional, sin embargo, el tratamiento de SexedULTRA™ de 4 millones de espermatozoides por dosis tuvo tasas de no retorno al estro similares al semen convencional de 15 millones de espermatozoides por dosis (Cuadro 3)⁽⁴⁵⁾. Con los datos obtenidos se demostró por primera vez el efecto de la dosis respuesta utilizando semen sexado y surgió la tecnología SexedULTRA-4M™ (4×10^6 espermatozoides/pajilla).

Cuadro 3: Efecto del incremento de la dosis espermática con semen SexedULTRA™ sobre las tasas de no retorno al estro a 56 días⁽⁴⁵⁾

Tratamiento	Número de inseminaciones	Tasa de no retorno al estro a 56 días (%)
Legacy 2.1 millones	1,953	55.9 ^a
SexedULTRA™ 2.1 millones	1,999	59.9 ^b
SexedULTRA™ 3.0 millones	2,013	60.0 ^b
SexedULTRA™ 4.0 millones	1,890	66.7 ^c
Convencional 15.0 millones	62,298	66.5 ^c

^{abc} Literales distintas en la misma columna difieren ($P < 0.001$).

En el caso de ovulación múltiple, se evaluó el uso de semen SexedULTRA™ en donadoras de embriones Holstein lactantes. En este trabajo utilizaron tres dosis de FSH para la ovulación múltiple e inseminaron con semen SexedULTRA™. Con las dosis más altas de FSH se obtuvieron 4.5 embriones, sin encontrar diferencia entre las calidades (Cuadro 4)⁽⁴⁶⁾.

Cuadro 4: Porcentajes de todas las estructuras recuperadas, embriones transferibles y no transferibles de vacas lecheras lactantes superovuladas con tres protocolos⁽⁴⁶⁾

	F700	F1000	F700 P300
Estructuras totales	4.7 ± 3.0 ^a	8.1 ± 3.8 ^b	8.5 ± 6.4 ^b
Embriones transferibles (%)	1.9 ± 1.7 ^a (41.2)	4.4 ± 2.6 ^b (54.7)	4.5 ± 3.3 ^b (52.9)
Embriones no transferibles (%)	2.8 ± 3.2 (58.8)	3.6 ± 2.9 (45.3)	4.0 ± 5.4 (47.1)
Grado 1* (%)	19/33 (57.6)	96/150 (64.0)	66/117 (56.4)
Grado 2* (%)	13/33 (39.4)	46/150 (30.7)	43/117 (36.8)
Grado 3* (%)	1/33 (3.0)	8/150 (5.3)	8/117 (6.8)
Media de Grado*	1.45 ± 0.5	1.41 ± 0.6	1.50 ± 0.6

F700= Folltropin 700 UI, F1000= Folltropin 1000 UI, F700P300= Folltropin 700 UI+Pluset 300UI.

* Grados de calidad (IETS 1-3) de embriones bovinos transferibles recuperados de vacas lecheras lactantes superovuladas con tres protocolos.

^{ab} Literales distintas en la misma columna difieren ($P < 0.05$).

Tecnología SexedULTRA-4M™ y su aplicación en campo respecto al semen convencional

En el caso de la tecnología SexedULTRA-4M™ (4×10^6 espermatozoides/pajilla)⁽⁴⁷⁾, se evaluó el uso del semen SexedULTRA-4M™ en inseminación artificial a tiempo fijo utilizando vacas y vaquillas de carne. Sus resultados muestran que no hubo diferencia significativa ($P=0.61$) en cuanto al porcentaje de preñeces entre el semen convencional (61.9 %) y el semen SexedULTRA-4M™ (63.8 %), cuando las hembras presentaron celo antes de la inseminación artificial a tiempo fijo.

En otro experimento⁽⁴⁸⁾ se comparó el uso de semen convencional y semen SexedULTRA-4M™ en IA utilizando tres toros (Angus) diferentes y vacas de carne. En este estudio, se encontró que la fertilidad está influenciada por el toro, ya que solo uno de tres toros no tuvo diferencias en cuanto al porcentaje de gestaciones al comparar el semen convencional y el SexedULTRA-4M™, lo cual muestra que existe diferencia entre toros, así como ocurre con el semen sexado Legacy.

En el caso de ganado lechero, mediante IA de vacas Holstein en pastoreo evaluaron el semen convencional y el semen SexedULTRA-4M™ de 10 toros y se concluyó que el semen SexedULTRA-4M™ tiene menor tasa de concepción comparado con el semen convencional; sin embargo, eso depende del toro, de la fertilidad de la vaca y del hato⁽⁴⁹⁾.

Producción *in vitro* de embriones con semen SexedULTRA-4M™

A la fecha, existe muy poca información acerca del uso de semen sexado SexedULTRA-4M™ en la PIV. En un trabajo, se evaluó este semen en PIV y se encontró que el semen SexedULTRA-4M™ generó mayor número de embriones congelables comparado con el semen sexado Legacy (13.2 y 9.2 % respectivamente; $P>0.05$)⁽⁸⁾. En otros dos trabajos, se evaluó la PIV utilizando semen convencional y SexedULTRA-4M™ del mismo toro, utilizando ovocitos de animales adultos⁽⁵⁰⁾ y utilizando ovocitos de hembras prepúberes de 6 meses de edad⁽⁵¹⁾ y no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los blastocistos producidos con semen convencional y los producidos con SexedULTRA-4M™ en ambos trabajos; sin embargo, en el caso de los animales adultos hubo mayor número de blastocistos con el semen SexedULTRA-4M™ (43.6 y 37.8 % respectivamente; $P>0.05$), sin ser estadísticamente significativo. En otro trabajo se evaluó la PIV utilizando semen convencional y SexedULTRA-4M™ de cuatro toros de la raza Angus; en este estudio se encontró que hubo dos toros que fueron significativamente superiores para la producción de

blastocistos con el semen SexedULTRA-4M comparado con el semen convencional (24.2 y 20.4 %; 14.2 y 10.4 % respectivamente ($P<0.05$). En este trabajo también se concluyó que los resultados de la PIV con semen SexedULTRA-4M fueron similares a los obtenidos con semen convencional⁽⁵²⁾.

Otras técnicas de sexado espermático

Lumisort™

Lumisort™ (Microbix Biosystems Inc., ON, Canadá) es una tecnología de sexado espermático de nueva generación para la industria ganadera. El método Lumisort combina un sistema óptico para la detección del sexo de los espermatozoides, con un láser rápido y eficaz que destruye a los espermatozoides que no son del sexo deseado. Los espermatozoides no sufren daños debidos a la presión hidrostática, no utiliza gotas por lo que no requiere de vibraciones para alinear los espermatozoides, no requiere de cargas eléctricas y los espermatozoides seleccionados son separados gentilmente. Se inició por primera vez en el año 2005 y posteriormente se introdujo en la industria lechera en 2013⁽¹⁰⁾, sin embargo, no hay trabajos publicados en revistas científicas donde se evalúe esta tecnología.

SexCell™ (Ablación de género)

Esta tecnología es muy reciente, al igual que la tecnología de Lumisort, el sexado se realiza por medio de citometría de flujo y los espermatozoides del sexo no deseado son destruidos⁽⁹⁾, sin embargo, no se describe a detalle como es el proceso de sexado. Esta tecnología ha sido generada por la compañía Genus-IntelliGen Technology⁽⁵³⁾ y es comercializada por la compañía ABS (WI, USA)⁽⁵⁴⁾. Solo existe una publicación en la que evaluaron la tasa de concepción en vacas y vaquillas de carne inseminadas con semen convencional y semen sexado por ablación de género. El semen convencional tuvo resultados estadísticamente superiores comparado con el semen sexado en vacas, sin embargo, en vaquillas no hubo diferencia significativa entre el semen convencional y el semen sexado⁽⁹⁾.

Técnicas en desarrollo

Sexado espermático mediante nanopartículas de oro

Esta técnica emplea nanopartículas de oro funcionalizadas (AuNPs) para detectar secuencias específicas del cromosoma “Y”, en espermatozoides morfológica y funcionalmente intactos.

El primer paso consiste en el ingreso de las AuNPs a través de la membrana del espermatozoide. Posteriormente, se da un acoplamiento no invasivo de una secuencia de DNA específica con la doble cadena de DNA espermático. Una vez acopladas, se da el reconocimiento del patrón de señal específico del cromosoma “Y” para identificar la población de espermatozoides⁽¹⁰⁾.

Sexado espermático mediante nanopartículas magnéticas

Esta técnica solo se ha reportado en burros, sin embargo, posteriormente se podría emplear en otras especies. Las nanopartículas magnéticas (MNPs) tienen un diámetro de 50 nm y están compuestas por un núcleo de magnetita de hierro cubierto de sílice, y se cargan negativamente. Las MNPs se mezclan con el semen y se exponen a un imán durante 20 min. La interacción entre la carga negativa de las MNPs y el potencial eléctrico de los espermatozoides es diferente para aquellos espermatozoides con cromosoma “X” (20 mV) y aquellos con cromosoma “Y” (16 mV). De esta forma los espermatozoides con cromosoma “Y” se van a mantener más cerca a las MNPs y van a formar un acúmulo de espermatozoides, y de esta manera se pueden separar las poblaciones⁽¹¹⁾.

Perspectivas a futuro

Es notable el avance de las diferentes tecnologías involucradas en el sexado espermático. Esto muestra que el sexado espermático está en continua evolución y cada vez con mejores resultados, tanto para la inseminación artificial como para otras biotecnologías como la producción *in vivo* e *in vitro* de embriones en bovinos, lo cual podría ser aplicado a otras especies como los ovinos, caprinos, equinos y cerdos. Por tal motivo, se vislumbra que en un futuro no muy lejano, esta tecnología desplace al semen convencional o incluso que no se requiera de equipos costosos y sofisticados para poder llevarla a cabo.

Literatura citada:

1. Seidel Jr GE, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2002;124:733-743.
2. Garner DL. Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. *J Androl* 2001;22(4):519-26.
3. Garner DL, Seidel Jr GE. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian J Anim Sci* 2003;83:375-384.

4. Seidel Jr GE. Sperm sexing technology. The transition to commercial application. An introduction to the symposium "Update on sexing mammalian sperm". *Theriogenology* 2009;71:1-3.
5. Garner DL, Seidel Jr GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 2008;69:886-895.
6. Oses MV, Teruel MT, Cabodevila JA. Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *RedVet* 2009;20:138-145.
7. Espinosa CR, Córdova AI. Sexing sperm of domestic animals. *Trop Anim Health Prod* 2012;45(1):1-8.
8. González-Marin C, Lenz RW, Gilligan TB, Evans KM, Gongora CE, Moreno JF, *et al.* SexedULTRA™, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and *in vitro* fertility. *Reprod Fertil Dev* 2017;29(1):204.
9. Perry GA, Walker JA, Rich JJJ, Northrop EJ, Perkins SD, Beck EE, *et al.* Influence of Sexcel™ (gender ablation technology) gender-ablated semen in fixed-time artificial insemination of beef cows and heifers. *Theriogenology* 2020;146:140-144.
10. Yadav HP, Sahu SK, Lone SA, Shah N, Singh A, Verma UK, *et al.* Advances in sperm sexing. *J Exp Zool India* 2018;21(1):1-9.
11. Domínguez E, Moreno-Irusta A, Castex HR, Bragulat AF, Ugaz C, Clemente H, *et al.* Sperm sexing mediated by magnetic nanoparticles in donkeys, a preliminary *in vitro* study. *J Equ Vet Sci* 2018;65:123-127.
12. Gledhill BL, Lake S, Steinmetz LL, Gray JW, Crawford JR, Dean PN, *et al.* Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J Cell Physiol* 1976;87(3):367-375.
13. Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 2006;65(5):943-957.
14. Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, *et al.* Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod* 1983;28(2):312-321.
15. Johnson LA, Pinkel D. Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 1986;7(3):268-273.
16. Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res* 1987;16(1):1-9.

17. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 1989;41(2):199-203.
18. Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D, Polge C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. *Vet Rec* 1993;132(2):40-41.
19. Seidel Jr GE, Johnson LA, Allen CA, Welch GR, Holland MD, Brink Z, *et al.* Artificial insemination with X- and Y-bearing bovine sperm. *Theriogenology* 1996;45:309.
20. Seidel Jr GE, Allen CH, Johnson LA, Holland MD, Brink Z, Welch GR. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed sperm. *Theriogenology* 1997;48:1255–1264.
21. Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel GE Jr. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1999;52(8):1375-1391.
22. <https://www.stgen.com> Consultada 15 Sep, 2020.
23. Bodmer MF, Janett M, Hässing N, den Dass P, Reichert R, Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 2005;64:1647-1655.
24. Frijters ACJ, Mullaart E, Roelofs RMG, van Hoorne RP, Moreno JF, Moreno O, *et al.* What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 2009;71:64-67.
25. Gosálvez J, Ramirez MA, López-Fernández C, Crespo F, Evans KM, Kjelland ME, *et al.* Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology* 2011;75:197-205.
26. DeJarnette MJ, McCleary CR, Leach MA, Moreno JF, Nebel RL, Marshall CE. Effects of 2.1 and 3.5×10^6 sex sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J Dairy Sci* 2010;93:4079-4085.
27. Seidel Jr GE, Schenk JL. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim Reprod Sci* 2008;105:129-138.
28. Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, *et al.* Insemination of heifers with sexed sperm *Theriogenology* 1999;52:1407-1420.

29. Morotti F, Sanches BV, Pontes JH, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, *et al.* Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 2014;81(5):696-701.
30. Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WM, Evans G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;118(1):7-12.
31. Underwood SL, Bathgate R, Pereira DC, Castro A, Thomson PC, Maxwell WM, *et al.* Embryo production after *in vitro* fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology* 2010;73(1):97-102.
32. Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WM, Evans G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;118(2-4):171-175.
33. Mikkola M, Taponen J. Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 2017;87:135-140.
34. Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* 2010;73(5):698-703.
35. Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 2009;71(1):68-73.
36. 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;65:219-227.
37. Lu KH, Cran DG, Seidel Jr GE. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically sorted bovine sperm. *Theriogenology* 1999;52(8):1393-1405.
38. Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Matthews DL. *In vitro* production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *J Dairy Sci* 2005;88:776-782.
39. Malcom V, Marfil M, Calvi M, Rigali F, Pugliese M, Gutierrez j. Comparison of *in vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed sex-sorted and sex-sorted frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2006;19:298.

40. Siqueira LGB, Dikmen S, Ortega MS, Hansen PJ. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by *in vitro* embryo production using reverse X-sorted semen. *J Dairy Sci* 2017;100(7):5899-5908.
41. Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: high speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999;52:1323-1341.
42. Vishwanath R, Moreno JF. Review: Semen sexing – current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal* 2018;12(Suppl 1):1-12.
43. Gonzalez-Marin C, Gongora CE, Guilligan TB, Evans KM, Moreno JF, Vishwanath R. *In vitro* sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex sorted sperm compared to non sorted bovine sperm. *Theriogenology* 2018;114:40-45.
44. Vishwanath R. SexedULTRA – raising the fertility bar of sexed sorted semen. In Proc 25th technical conference on artificial insemination and reproduction. National Association of Artificial Breeders, September 2014, Wisconsin, USA, 57-61.
45. Lenz RW, Gonzalez-Marin C, Gilligan TB, DeJarnette JM, Utt MD, Helser LA, *et al.* SexedULTRA™, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves conception rates. *Reprod Fertil Dev* 2017;29(1):203-204.
46. Dell'Eva G, Bolognini D, Lacono E, Merlo B. Superovulation protocols for dairy cows bred with SexedULTRA™ sex sorted semen. *Reprod Domest Anim* 2019;54:756-761.
47. Crites BR, Vishwanath R, Arnett AM, Bridges PJ, Burris WR, McLeod KR, *et al.* Conception risk of beef cattle after fixed-time artificial insemination using either SexedUltra™ 4M sex-sorted semen or conventional semen. *Theriogenology* 2018;118:126-129.
48. Thomas JM, Locke JWC, Bonacker RC, Knickmeyer ER, Wilson DJ, Vishwanath R, *et al.* Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex sorted semen in timed artificial insemination programs for mature beef cows. *Theriogenology* 2019;123:100-107.
49. Maicas C, Holden SA, Drake E, Cromie AR, Lonergan P, Butler ST. Fertility of frozen sex sorted sperm at 4×10^6 sperm per dose in lactating dairy cows in seasonal-calving pasture based herds. *J Dairy Sci* 2020;103:(1):929-939.
50. Álvarez H, Kjelland M, Villaseñor F, Pérez M, Romo S. Comparison of sexed semen ULTRA-4M with conventional semen for the *in vitro* production of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2020;32(1):161-162.

51. Velázquez A, Álvarez H, Kjelland M, Villaseñor F, Ariza G, Romo S. *In vitro* embryo production using prepubertal calf oocytes with conventional semen and sexed semen ULTRA-4M. *Reprod Fertil Dev* 2020;32(1)162.
52. Álvarez-Gallardo H, Kjelland ME, Pérez-Martínez M, Villaseñor-González F, Romo-García S. Evaluation of novel SexedULTRA-4M technology for *in vitro* bovine embryo production. *Anim Reprod* 2022;19(1)e20220018.
53. <https://www.genusintelligen.com> Consultada 15 Sep, 2020.
54. <https://www.absglobal.com/mx/services/sexcel/> Consultada 15 Sep, 2020.