

[REPRODUCCIÓN]

Principios y aplicaciones de la producción *in vitro* de embriones en ganado vacuno

Miguel Ángel Silvestre

Alberto Cebrián-Serrano

Ignacio Salvador

Centro de Tecnología Animal (CITA), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

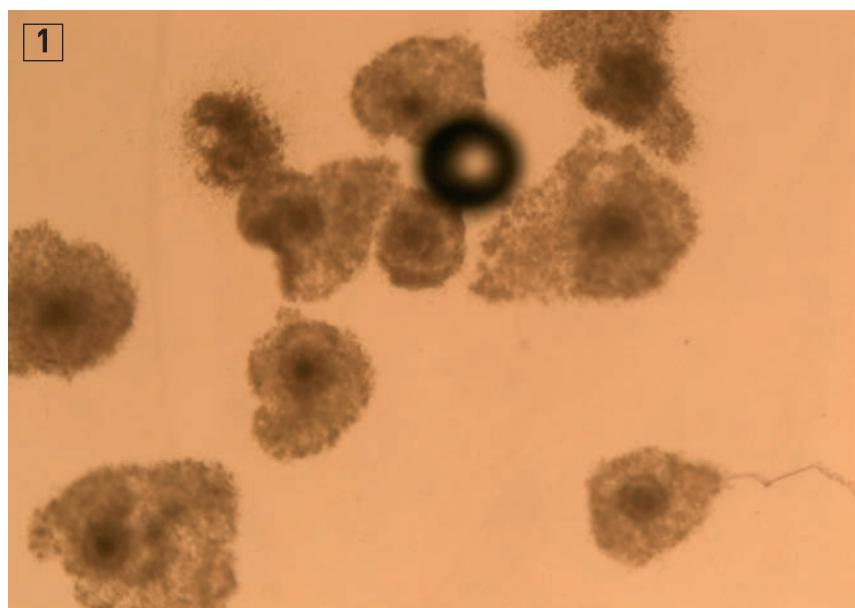
Empar García-Roselló

Universidad CEU-Cardenal Herrera. Facultad Ciencias Experimentales y de la Salud (Veterinaria)

Daniel Felipe Salamone

Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (Argentina)

La biotecnología de la reproducción en la especie bovina surge como respuesta a ciertas demandas del sector ganadero, sobre todo, en la mejora de la productividad de las explotaciones. Desde que en los 70 se desarrollara la transferencia de los embriones producidos *in vivo* y empezara su comercialización en Norteamérica, hoy en día se supera la cifra de 600.000 embriones de vacuno producidos y transferidos, más de un 15% de ellos *in vitro*.



Complejos cúmulo-ooocito de vacuno

En este artículo los autores pretenden revisar las aplicaciones, los pasos de los cuales se compone y las eficacias que en vacuno tiene esta tecnología. La transferencia de embriones de vacuno con fines comerciales ha llegado a convertirse, en un espacio de unos 30 años, en un importante negocio a escala internacional (Mapletoft y Hasler, 2003). En la década de los 70 se desarrolló la transferencia de los embriones producidos *in vivo* y empezó su comercialización en los EE.UU. y Canadá (Betteridge, 2003).

Sin embargo, fue en 1987, cuando se introdujo el concepto de ovulación múltiple y transferencia embrionaria (MOET), mostrándose que permitiría un incremento de la intensidad de selección y una reducción del intervalo generacional, resultando en un incremento de la mejora genética (revisión de Mapletoft y Hasler, 2003).

En 2003, según la Asociación Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS), se produjeron y transfirieron

en el mundo más de 600.000 embriones de vacuno de los cuales más de un 15% (>100.000 embriones) fueron producidos *in vitro* (PIV). Sin embargo, cabe destacar que el 60% de los embriones PIV se obtuvieron en Sudamérica, en especial en Brasil.

[Definición

El desarrollo de la producción *in vitro* de embriones de mamífero es una tecnología que tiene múltiples aplicaciones tanto en biomedicina como en producción animal. Así, esta técnica posibilita dotarnos de los conocimientos básicos para entender el mismo proceso *in vivo* y para poder abordar otras líneas de investigación como son la criopreservación de gametos y embriones, la transferencia de embriones, la transferencia nuclear y la producción de embriones genéticamente modificados.

La PIV de embriones de calidad a partir de material de matadero (ovarios de animales de abasto) es crucial



La PIV de embriones de calidad a partir de material de matadero es la estrategia más barata, y permite disponer de un número elevado de óvulos para poder abordar con garantías el desarrollo de las anteriores líneas en especies ganaderas

en mamíferos. Esta estrategia es la más barata y permite disponer de un número elevado de efectivos (óvulos) para poder abordar con garantías el desarrollo de las anteriores líneas en especies ganaderas.

Pasos de la producción *in vitro* de embriones

La PIV de embriones se divide en tres etapas: maduración oocitaria, fecundación y cultivo embrionario.

Maduración *in vitro* de los óvulos

Los óvulos u oocitos que se recogen de los folículos son inmaduros y tienen que progresar su maduración en un sistema *in vitro*. Los óvulos están recubiertos por varias capas de células denominadas células del cúmulo. Los oocitos mantienen un estrecho contacto a las células del cúmulo y se denominan en conjunto complejos cúmulo-oocito (**Foto 1**). Los oocitos se maduran en un medio complejo (medio 199) suplementado con suero,

hormonas y factores de crecimiento (EGF) durante 20-22 horas.

Los oocitos se cultivan a 38,5°C en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂. Normalmente más del 80% de los oocitos consiguen progresar parándose nuevamente en un estadio denominado “metafase II” a la espera de ser fecundados por los espermatozoides para reanudar el ciclo.

Fecundación *in vitro*

Una vez los oocitos han madurado *in vitro*, para la fecundación *in vitro*, se co-cultivan los complejos cúmulo-oocito con los espermatozoides, en una concentración de 1 millón de espermatozoides por mililitro, durante 18 h en medio de fertilización en las mismas condiciones de cultivo que se describían en el punto anterior. El semen que se utiliza suele ser semen congelado procedente de toros de alto valor genético (salvo que se trate de estudios experimentales en los que no hace falta). Se pueden inseminar unos 50 óvulos con 500.000 espermatozoides y de los que se fecundan cerca del 75%.

Cultivo *in vitro*

Los oocitos fecundados o cigotos se cultivan a 38,5°C en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂ y 5% de O₂ en un medio complejo denominado SOF (Fluido Oviductal Sintético) durante 7 días. Normalmente un 25-35% de los embriones que se dividen alcanzan el estadio de blastocisto (**Foto 2**).

En este estadio, el embrión ya no se parece a un racimo de células como ocurre en el estadio de mórula, sino que tiene una morfología específica, en el interior del embrión, se ha formado una cavidad (blastocelo) y es posible diferenciar dos tipos celulares (trofoblasto y masa celular interna) y el embrión tiene aproximadamente unas 90 células (**Foto 3**).

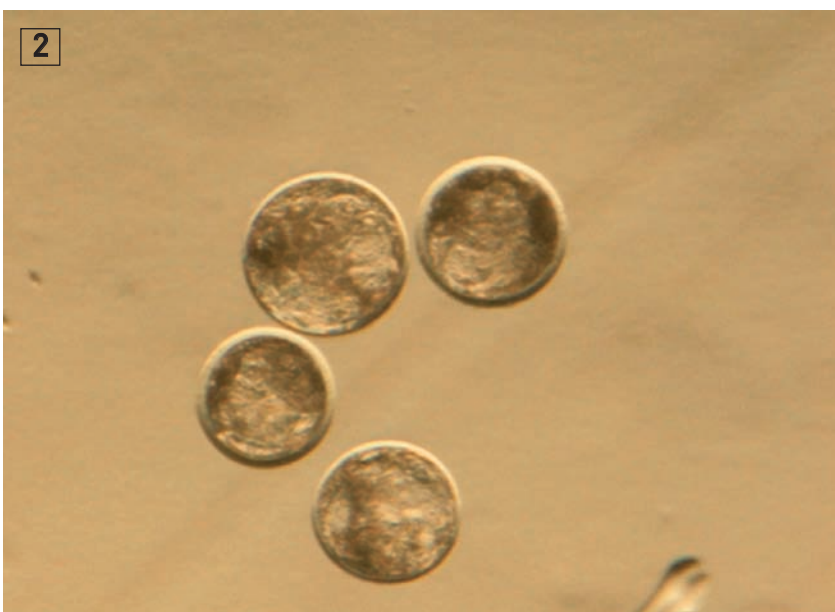
Las tasas de gestación, después de la transferencia de embriones producidos *in vitro*, varían entre un 20% y un 40% y son significativamente inferiores a las de los obtenidos *in vivo* que varían de un 40% a un 60%, dependiendo de la calidad de los embriones (Palma, 2001).

Aplicaciones de la técnica de producción de embriones *in vitro*

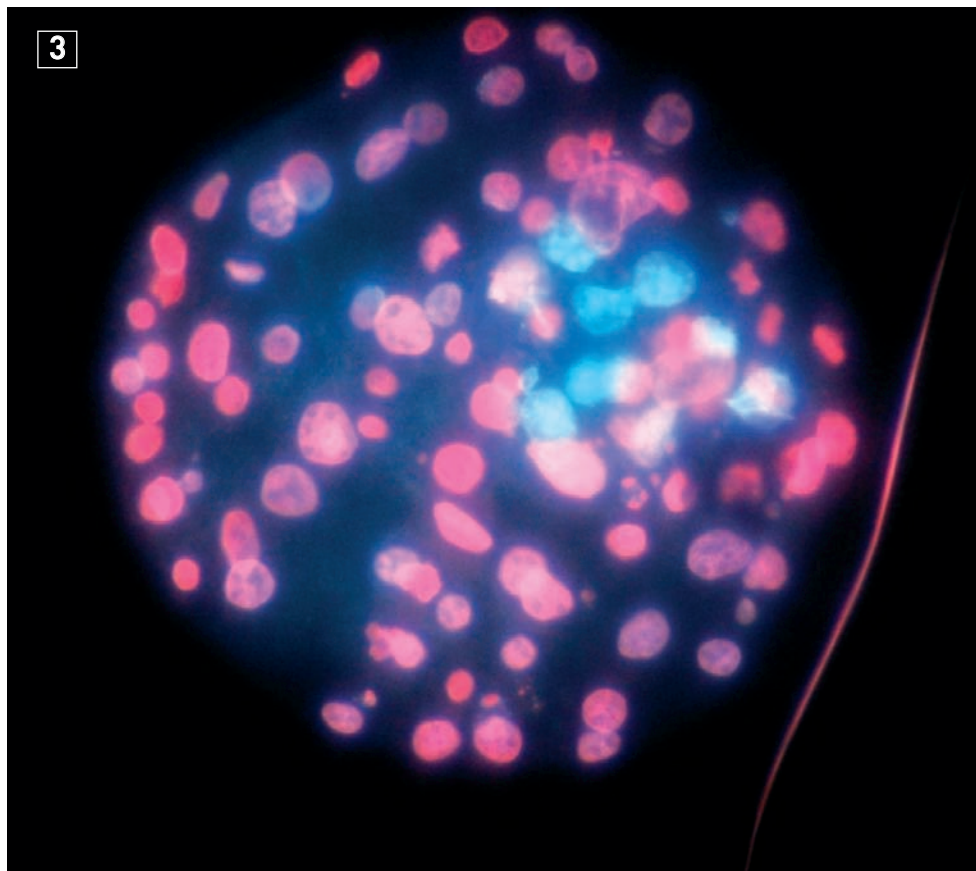
En vacuno, la técnica de PIV está más desarrollada que en otras especies, aún así su rendimiento no es excesivamente elevado y la calidad de los embriones *in vitro* es inferior a los producidos *in vivo*. Las posibles aplicaciones de la producción *in vitro* de embriones dependerán en gran medida del origen de los óvulos, si proceden o no de un animal de alto valor genético.

Así, dependiendo de este punto de partida las eficacias pueden o no ser rentables. Cuando hacemos referencia a que un óvulo procedente de un animal de alto valor genético, ya sea dentro de un programa de producción o de conservación de recursos, asociamos la obtención de los óvulos a la técnica de la OPU (Ovum Pick-Up), a no ser que el animal haya muerto y se recuperen los óvulos de los ovarios mediante técnicas típicas de laboratorio que se utilizan con ovarios de animales de matadero.

La OPU consiste en recolectar los óvulos *in vivo* mediante la punción “ecoguiada” de los folículos del ova-



Embriones de vacuno producidos *in vitro*



Tinción de núcleos de un embrión de vacuno producido *in vitro*

rio. La recogida no es quirúrgica y se utiliza un tranquilizante y anestesia local. Esta técnica se realiza introduciendo el transductor del ecógrafo y una aguja ensamblada a un sistema de guía por la vagina.

Por manipulación rectal se fija el ovario al extremo de la aguja y se aspira el contenido de los folículos observando el colapso de los folículos en la pantalla del ecógrafo. Del líquido folicular aspirado, se aíslan los óvulos que se procesarán a continuación madurándolos en un sistema *in vitro*, posteriormente se fecundarán y cultivarán *in vitro* hasta el estadio de mócula o blastocisto.

En este estadio, los embriones se pueden congelar o transferir a una

hembra receptora. Mediante esta técnica se pueden recuperar aproximadamente 10 óvulos por sesión (Galli *et al.*, 2001). Sin embargo, esta cifra puede variar dependiendo del intervalo de tiempo entre las sesiones de recuperación, del equipo de técnicos y de la existencia o no de un tratamiento de pre-estimulación hormonal (superovulación). La recogida de los óvulos puede realizarse una o dos veces a la semana.

Aplicaciones principales de los embriones PIV asociadas a la OPU

El procedimiento OPU/PIV puede ser aplicado fundamentalmente en tres situaciones (Palma, 2001):

- 1)- Uso de hembras que no responden a la superovulación.
- 2)- Uso de hembras prepúberes, aunque la optimización de esta vía dependerá en parte de solucionar la competencia de los óvulos de animales prepúberes (Salamone *et al.*, 2001).
- 3)- Incrementar el porcentaje de recuperación de embriones:

En este sentido, en un estudio realizado por Merton *et al.* (2003), se estimó que aproximadamente se obtenía 1 embrión por sesión de OPU frente a los 5 embriones que se podían obtener mediante un tratamiento estándar de superovulación. Sin embargo, el rendimiento a la semana del sistema OPU es de 2 embriones por semana (cuando se recupera 2 veces a la semana) frente a 1 embrión que se puede producir mediante un tratamiento estándar de superovulación.

Así, el rendimiento global se estimaba alrededor de 50 embriones congelables por vaca y año mediante superovulación y 150 embriones por año por OPU, aunque dependía mucho del técnico que se encargase de la recuperación de los óvulos.

A pesar de las ventajas que ofrece la transferencia de embriones producidos *in vitro*, se han detectado algunos problemas asociados a esta técnica. En primer lugar, la OPU requiere una mayor especialización de la mano de obra, un equipo de ecografía caro y un laboratorio de PIV de embriones. También, se ha observado el síndrome del ternero gigante y un aumento de la proporción de machos (Hansen y Block, 2004).

El aumento del tamaño de los terneros puede constituir un problema grave de manejo, ya que ocasiona partos distócicos que comprometen la salud de las vacas y la aceptación por el ganadero. La eliminación del suero del medio de cultivo puede reducir la aparición de este síndrome.

El coste de la producción de embriones mediante la técnica OPU/PIV suele ser más elevado que mediante la producción *in vivo* (Mapletoft y Hasler, 2003). Además, los embriones PIV suelen resistir peor los procesos de congelación.

La transferencia de embriones producidos *in vitro* se ha visto incrementada en los últimos años tanto en números brutos como en porcentuales. Sin embargo, como hemos remarcado anteriormente, la mayoría se ha producido en Brasil, donde produce un tipo de vacuno, el cebú, que tiene una eficacia de recuperación de oocitos muy elevada (aproximadamente 25 por operación) en comparación con las razas lecheras europeas o norteamericanas (aproximadamente 10 por operación; Galli *et al.*, 2001).



Las posibles aplicaciones de la producción *in vitro* de embriones dependerán en gran medida del origen de los óvulos, si proceden o no de un animal de alto valor genético

Otras aplicaciones de los embriones PIV no asociadas a la OPU



El coste de la producción de embriones mediante la técnica OPU/PIV suele ser más elevado que mediante la producción *in vivo*. Además, los embriones PIV suelen resistir peor los procesos de congelación

1)- Paliar el descenso de fertilidad por el estrés térmico.

En la revisión de De Rensis y Scaramuzzi (2003) queda patente en vacuno el efecto del estrés térmico sobre la reproducción y las posibles estrategias para evitarlo.

El estrés por calor es uno de los mayores factores causantes de las bajas fertilidades en los meses de verano. El descenso en las tasas de gestación durante la estación calurosa (que en España, según regiones como en el Levante Español puede extenderse a 4 meses) puede variar entre un 20 y un 30% comparado con la estación invernal.

El efecto del estrés por calor en la fertilidad permanece casi hasta en otoño, ya que podría haber un efecto posterior del estrés térmico en los folículos antrales que se desarrollarán en los folículos dominantes entre 40 y 50 días más tarde.

Además del efecto del estrés térmico en la expresión de celo y en el eje hipófisis-hipotálamo-ovario, se produce un fuerte efecto del calor sobre los gametos, embriones y el desarrollo folicular (De Rensis y Scaramuzzi, 2003). Respecto a los gametos y embriones, el estrés térmico afectaría al ambiente intrauterino, disminuyendo el flujo sanguíneo e incrementando la temperatura uterina, estos cambios afectarían a los procesos de transporte, fecundación y desarrollo embrionario pre-implantacional. Sin embargo, el efecto del estrés térmico disminuiría a medida que avanza el desarrollo embrionario.

Una estrategia para evitar este descenso de fertilidad durante los meses de calor se basa en la transferencia embrionaria, utilizando esta técnica para "sortear" los efectos negativos del estrés térmico sobre la calidad oocitaria y sobre el desarrollo embrionario. Un estudio reciente de Al-katanani *et al.*, (2002), mostró como la transferencia embrionaria a tiempo fijo mejoraba las tasas de gestación en condiciones de estrés térmico, aunque solo lo lograron con embriones frescos (27% vs. 5-7%). Un embrión catalo-

gado de calidad buena o excelente, transferido en día 7, no se vería tan afectado por parte del estrés térmico como sufren los oocitos y los embriones tempranos.

2)- Estudios que necesiten un gran número de efectivos (óvulos o embriones).

Mediante el uso de la técnica de la superovulación, se puede obtener una media de 5 embriones por hembra donante pero presenta el inconveniente de que es un proceso caro y no se pueden obtener muchos embriones.

Además existe una mayor divergencia en el desarrollo embrionario de los obtenidos *in vivo* respecto a los *in vitro*, ya que de los primeros depende del momento de la ovulación y la fecundación, sin embargo, en el modelo *in vitro* el momento de la fecundación es más preciso y por lo tanto tiene una mayor sincronización (Palma, 2001).

Por ejemplo, el disponer de un gran número de embriones a un coste aceptable permite plantear diseños más ambiciosos para testar diversos protocolos de congelación de embriones. También, la PIV de embriones puede servir para testar la capacidad fecundante de un semen y así testar distintos protocolos de congelación, u otro tratamiento, de semen.

Como conclusión, resaltar que la técnica de PIV de embriones en ganado vacuno tiene un gran potencial, sin embargo, faltan por resolver algunos problemas, como los que hemos comentado anteriormente para que puedan ser implementados de forma masiva. En países como Canadá con explotaciones, en general, de alto valor genético, se han utilizado

oocitos de matadero para producir embriones los cuales se exportaban a otros países como China para mejorar la calidad genética de su ganadería nacional.

Para algunos autores puede ser una alternativa a los programas de producción *in vivo*, pero para otros no está tan claro, siendo solo ventajosa para animales de alto valor que son infértiles o no responden a tratamientos de superovulación (Mapletoft y Hasler, 2003). Van Wagten-donk-de Leeuw (2006) recomienda el uso de la OPU/FIV solo a compañías de genética debido a la baja eficacia y el alto coste de este procedimiento. La utilización de semen sexado puede llegar a incrementar el interés por abaratar el coste de semen y paliar los bajos resultados que se alcanzan con este tipo de semen.

Para las razas índicas, especialmente el Nelore, se ha demostrado que la OPU-PIV de embriones es más eficiente que la superovulación y producción *in vivo* de embriones de ahí su extenso uso en países como Brasil. Finalmente, la PIV de embriones de matadero sigue siendo la alternativa más económica para producir embriones para investigación.

Este trabajo ha sido financiado por el INIA (RTA2007-0110-00-00) y el Fondo Social Europeo

Bibliografía

- Al-katanani *et al.*, 2002. *Theriogenology*, 58,171-182.
- Betteridge, 2003. *Animal Reproduction Science*, 79, 203-244.
- Colleau *et al.*, 1998. *INRA Productions animales*, 11, 41-56.
- De Rensis y Scaramuzzi, 2003. *Theriogenology*, 60,1139-1151.
- Galli *et al.*, 2001. *Theriogenology*, 55, 1341-1357.
- Hansen y Block, 2004. *Reproduction, Fertility and Development*, 16, 1-14.
- Mapletoft y Hasler, 2003. *Rev sci tech Off int Epiz*, 24, 393-403.
- Merton *et al.*, 2003. *Theriogenology*, 59, 651-674.
- Palma, 2001. *Biotecnología de la Reproducción*. Ed. INTA.
- Salamone *et al.*, 2001. *Biol Reprod*, 64, 1761-1768.
- Wagten-donk-de Leeuw, 2006. *Theriogenology*, 65, 914-925. •