

Producción de embriones *in vitro* en el bovino: descripción de la técnica y ejemplos de su aplicación en España

Introducción

La transferencia de embriones que denominamos *in vivo* (ET) se refiere a la tecnología, ya clásica, desarrollada ya hace más de tres décadas, que consiste en el tratamiento de superovulación de una vaca donante, con el objeto de que ovule no sólo uno o dos ovocitos, como lo hace de manera fisiológica, sino hasta 10-15 veces más. Posteriormente, se insemina la vaca y 7 días más tarde se extraen los embriones de 7 días (en estadio de mórula o blastocisto). Por eso se denominan embriones *in vivo*, ya que están en la vaca donante durante todo el tiempo, hasta su recuperación, momento en el que se transfieren inmediatamente a una receptora (transferencia en fresco), para que continúe su gestación hasta el parto, o bien se congelan y conservan, hasta otro momento de transferencia (transferencia post-descongelación).

En definitiva se considera que esta técnica, cuya difusión y aplicación fue aumentando hasta finales de la década de los 90, se ha estabilizado en Europa desde el comienzo del último siglo. Entre 1999 y 2009, en España se han realizado una media anual de 477 superovulaciones, con 2.300 embriones *in vivo*. En 2010 en Europa se lavaron 17.855 donantes, con un total de 119.342 embriones transferibles. Este estancamiento se debe en parte a que, a pesar de que se han invertido y se siguen invirtiendo muchos esfuerzos en la mejora de cada uno de sus pasos (elección de donantes, sincronización y superovulación, técnica de *flushing* o lavado, valoración de los embriones, elección y sincroniza-

ción de receptoras, evaluación de las mismas y técnica de transferencia), los porcentajes de mejora en los resultados son ya muy escasos.

Hasta 2010, el rendimiento se encontraba estabilizado en torno a 4,8 embriones transferibles en la especie bovina, y problemas como la existencia de hembras que no responden a los tratamientos para inducir superovulación, la necesidad de respetar periodos de descanso entre dos recogidas consecutivas y la obligatoriedad de que las donantes estén en perfectas condiciones ginecológicas, impiden una mejora sustancial de los resultados de la ET, respecto a la actualidad (Herradón *et ál.*, 2007).

Sin embargo, es reseñable, que las últimas estadísticas europeas, con 17.855 donantes, y 119.342 embriones transferibles implican una media de 6,6 embriones transferibles por vaca, lo que supone una mejora considerable, respecto al estancamiento comentado de los años anteriores. Los expertos en la materia postulan la idea de que se deba a la difusión de la genética del toro "Kian", cuyas hijas son muy buenas productoras de embriones (Knijn, 2011; estadísticas de la AETE o *Association Européenne de Transfert Embryonnaire; European Embryo Transfer Association*).

En este marco se ha desarrollado un procedimiento alternativo para la producción de embriones: la producción de embriones *in vitro* (PIV) utilizando ovocitos inmaduros, recogidos directamente del ovario con independencia de la edad y de la situación fisiológica de la hembra.

Desde 1981, año en el que nació "Virgil", el primer ternero procedente de un embrión producido *in vitro* (Brackett *et ál.*, 1982) esta técnica ha experimentado en la especie bovina una evolución considerable, sustituyendo en algunos casos a la ET y superovulación (Herradón *et ál.*, 2007).

La recogida de los ovocitos de los ovarios, bien puede ser tras la muerte/sacrificio del animal y recuperación de los ovarios, o mediante la punción transvaginal de los ovarios (OPU de *Ovum Pick-up*) con la vaca viva y bajo seguimiento ecográfico.

Los datos estadísticos publicados por la *Interna-*

Susana Astiz¹, Jon Romero-Aguirregomez²,
Angel Poto³ y Salvador Ruiz²

¹ Dpto. Reproducción Animal. INIA. Madrid.
astiz.susana@inia.es

² Dpto. Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. sruiz@um.es jon.romero@um.es

³ Mejora Genética Animal. IMIDA. Murcia.
angel.poto@carm.es

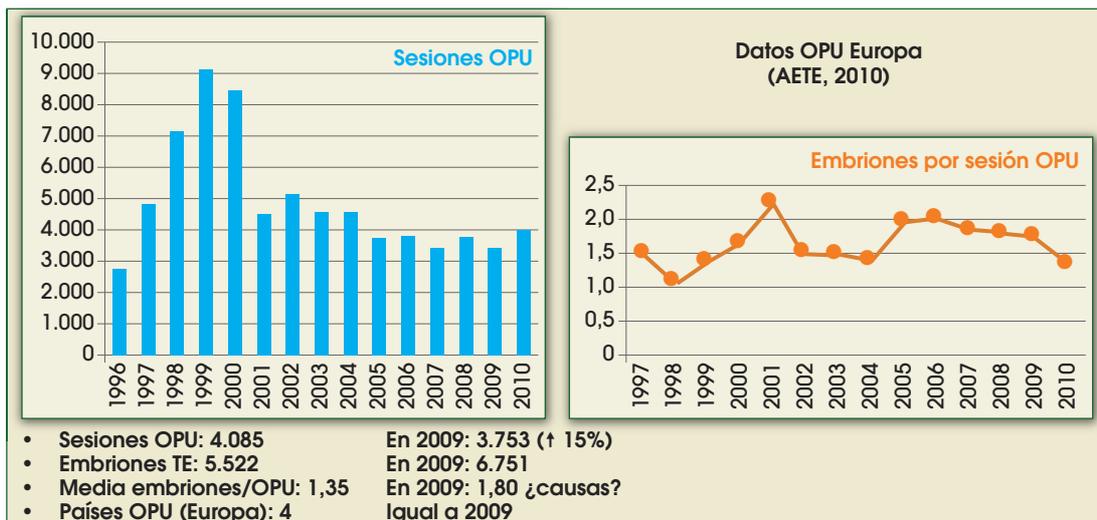


Figura 1: datos producción de embriones IVP en Europa. (Knijn, 2011)

tional Embryo Transfer Society (IETS) indican que durante el año 2006 se obtuvieron 440.000 embriones bovinos a nivel mundial mediante PIV, de los que fueron transferidos unos 290.000, cerca del 66% del total de embriones (Thibier, 2007).

En Europa, en 2010 se efectuaron un total de 4.085 sesiones de OPU, con una producción total de 5.522 embriones transferibles, lo que supone una media de 1.35 embriones transferibles por sesión. Dentro de todas las transferencias efectuadas en Europa en 2010, un 4.9% de los embriones transferidos eran embriones PIV (Figura 1).

La utilización de la PIV de embriones bovinos permite numerosas aplicaciones, entre las que destacamos:

- Aumenta el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, al permitir la obtención de ovocitos en novillas de más de 6 meses de edad, en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las 2-3 semanas del posparto (Galli *et ál.*, 2001).
- No hay interferencia con los ciclos productivos o reproductivos de la hembra donante, evitando la utilización de gonadotropinas.
- En el caso de contar con un laboratorio de PIV con fines de investigación, permite a los ganaderos de la zona disponer de embriones frescos a bajo coste, lo que posibilita transferir embriones de razas cárnicas en vacas de aptitud láctea no destinadas a la cría o utilizarlos para tratar la infertilidad por problemas de ovulación, fecundación o mortalidad embrionaria precoz. Este es un modelo de aplicación muy difundido en países de la Europa central.
- Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis, BSE).
- Permite el aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad (hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital) y facilita la utilización de semen sexado.

Sin embargo, esta técnica es todavía poco eficiente, lo que dificulta su aplicación a gran escala. El porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40% a partir de los ovocitos

recuperados e incluidos en el proceso de producción *in vitro* (Herradón *et ál.*, 2007).

Producción *in vitro* de embriones (PIV)

La producción de embriones *in vitro* (PIV) consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar a los resultados finales del proceso. Estas etapas pueden resumirse en las siguientes: obtención de ovocitos, selección de ovocitos, maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo de los cigotos resultantes hasta blastocistos (CIV).

1. Obtención de Ovocitos. Ovum Pick-Up (OPU)

La obtención de los ovocitos se realiza a través de dos procedimientos básicos:

- A partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm.
- A partir de animales vivos, utilizando la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU, *Ovum Pick-Up*; Figura 2).



Figura 2: operador realizando OPU en instalaciones específicas para ello de la Universidad de Murcia.

La OPU se desarrolló originalmente para la reproducción asistida en la mujer, usándose por primera vez en la vaca, en Holanda, a finales de los 80 (Pieterse *et ál.*, 1988). El empleo de OPU de forma rutinaria en reproducción asistida veterinaria se inicia en 1994.

La OPU es una técnica con muchas posibilida-

Producción de embriones *in vitro* en el bovino

des. Puede ser usada en vacas cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación y en las que no responden a estímulos hormonales; también, en animales con desórdenes reproductivos de origen no genético (Galli *et ál.*, 2001), y en terneras y novillas prepúberes a partir del 6°-8° mes de edad (Taneja *et ál.*, 2000).

Mediante OPU podemos trabajar con ovocitos obtenidos de vacas vivas elegidas, con alto valor genético conocido. Mediante la punción repetida, puede conseguirse un mayor número de embriones (hasta 100 embriones al año por vaca) respecto del obtenido mediante protocolos estándar de transferencia embrionaria *in vivo*. La aplicación conjunta de ambas tecnologías (OPU/PIV) permite la producción teórica máxima de 50 terneros por vaca donante y año (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006), por lo tanto, la recuperación repetida de ovocitos mediante OPU permitiría obtener la mayor descendencia posible de los animales más valiosos, acelerando los procesos de selección y mejora genética (vía paterna y materna).

Después del desarrollo inicial de la técnica de OPU, se han llevado a cabo muchos estudios investigando diversos factores que puedan incrementar los resultados. Éstos se pueden dividir en factores técnicos y biológicos (Ruiz, 2010):

- a. **Factores Técnicos.** Se ha investigado sobre la geometría de la aguja de aspiración y la presión de vacío (Bols *et ál.*, 1995, 1996) con lo que se ha conseguido mejorar la calidad de los ovocitos recogidos. La mejora técnica más significativa ha sido la sustitución de la aguja original de 50 cm de longitud por una aguja mucho más corta (7 cm), estéril, descartable y fácilmente reemplazable entre diferentes donantes, reduciendo así el riesgo de contaminación.
- b. **Factores Biológicos.** Entre éstos podemos incluir los siguientes: el animal donante, la pre-estimulación hormonal, el tiempo y frecuencia de la OPU y la experiencia del operador.

Animal donante. Al igual que en los sistemas de ET, la vaca donante puede explicar aproximadamente un 20% de la variación observada en términos de ovocitos por OPU y de eficiencia en la producción de embriones.

Pre-estimulación con FSH. La mejora más significativa con respecto al rendimiento en la calidad de los ovocitos y, por consiguiente para la producción de embriones, ha sido la pre-estimulación hormonal previa a la OPU mediante el uso de gonadotropinas (FSH) 48 h antes de la aspiración. Chaubal *et ál.* (2006) realizaron un estudio comparativo entre sistemas de OPU con y sin estimulación hormonal, concluyendo que la retirada del folículo dominante seguida de la administración de FSH y de OPU 48 h más tarde, fue el mejor protocolo en base a la respuesta folicular, la recuperación de ovocitos y la producción de embriones. El ensayo fue realizado con éxito, durante 10 semanas seguidas. Estos autores emplearon una dosis semanal única de FSH, reducida en comparación con la dosis completa estándar que se utiliza en la ovulación múltiple de rutina en el sistema ET, lo que reduce el estrés asociado con múltiples inyecciones de FSH.

Frecuencia de OPU. El intervalo entre sesiones de OPU tiene influencia sobre la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos. El periodo de tiempo entre dos aspiraciones afecta de forma significativa la tasa de producción de ovocitos, obteniéndose un mayor número de embriones cuando se realiza la OPU cada 7 días en comparación con la obtención cada 3 ó 4 días (Rizos, 2009).

Experiencia del operador. La técnica de OPU se realiza por 1 ó 2 personas y en determinadas empresas, la misma persona lleva a cabo el desarrollo de la técnica de una forma similar durante años, usando las mismas condiciones técnicas. La experiencia del operador (en un sistema de una sola persona) o del operador y el ayudante (en un sistema de dos personas) tiene un efecto significativo en el número y la calidad de los ovocitos recolectados (Merton *et ál.*, 2003) y hasta cierto punto, una adecuada selección de los operadores y/o asistentes puede ayudar a mejorar los resultados.

2. Selección de ovocitos

La selección de los ovocitos se realiza en base a criterios que valora el técnico al observarlos a la lupa y son: diámetro, aspecto del citoplasma y características de las células del cúmulo (las que rodean al ovocito).

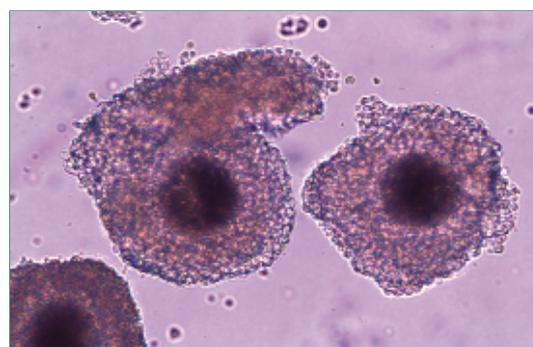


Figura 3: ovocitos bovinos aspirados tras OPU

3. Maduración *in vitro* (MIV)

La MIV constituye una etapa decisiva en el rendimiento del proceso de PIV. Consiste en cultivar durante 24 horas los ovocitos inmaduros en un medio adecuado, suplementado con suero fetal, gonadotropinas (FSH y LH) y 17 β -estradiol, a una temperatura de 38'5°C en una atmósfera con un 5% CO₂ en aire (en una incubadora o estufa, en el laboratorio). Continuamente se publica información y resultados de investigaciones que mejoran y definen mejor las características de este proceso, en continuo desarrollo.

4. Fecundación *in vitro* (FIV)

Una vez que disponemos de ovocitos maduros, el siguiente objetivo es lograr la fecundación de los mismos. Para ello se incuban junto con espermatozoides capacitados en un medio adecuado, e igualmente en estufa con atmósfera controlada.



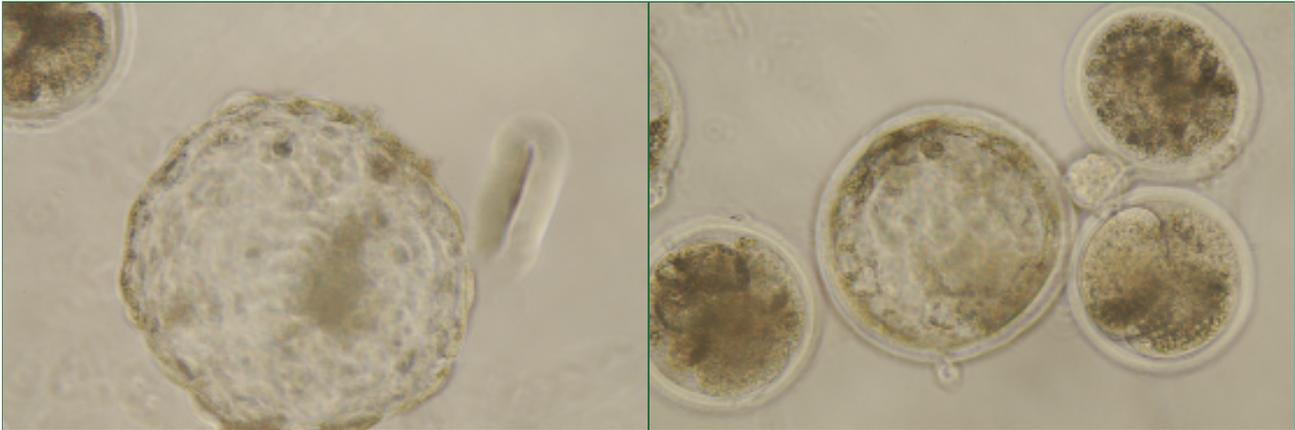


Figura 4: embriones bovinos producidos in vitro. Días 7-8 post-fecundación. Imagen izquierda se observa un blastocisto eclosionado e imagen derecha se observa un blastocisto expandido en el centro.

5. Cultivo *in vitro* (CIV)

Una vez fertilizados los ovocitos, podemos hablar de embriones. A partir de este momento, los embriones se deben cultivar, para que vayan desarrollándose mediante sucesivas divisiones celulares. Para ello, se mantienen en estufa, en medios específicos para el cultivo de los mismos, durante 6-7 días, hasta su transferencia (en fresco) o congelación o vitrificación (figura 4)

Los primeros intentos de cultivar embriones bovinos *in vitro* se toparon con la dificultad de que los embriones no superaban la etapa de 8 a 16 células ("bloqueo del desarrollo") (Eyestone y First, 1991). Para evitar este bloqueo se utilizó el cocultivo con otras células o medios condicionados por dichas células (Fukui y Ono, 1989). Posteriormente, se pudieron lograr elevados porcentajes de blastocistos (embriones con un adecuado desarrollo a día 6-7) en ausencia de células somáticas con condiciones de estufa determinados y con medios ya definidos, sin inclusión de suero.

Aplicación de la técnica OPU-PIV en la recuperación de la vaca Murciano-Levantina

A día de hoy y en España hay grupos que llevan a cabo esta técnica, aunque en general, no de manera comercial, sino en el ámbito de la investigación, o de programas de recuperación de razas bovinas especialmente amenazadas.

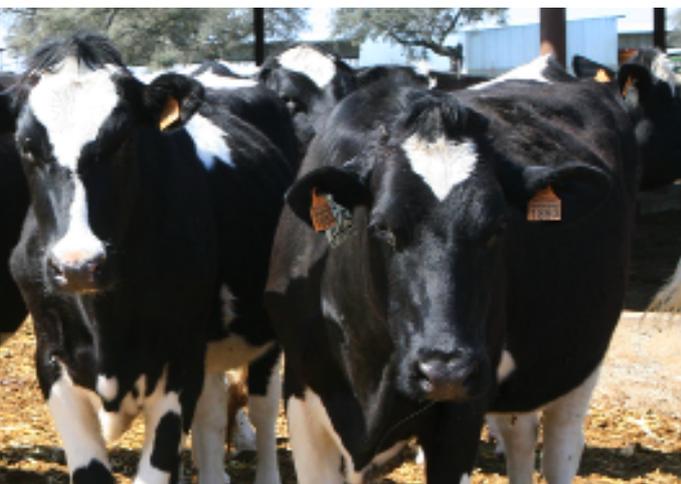
Este es el caso del programa financiado por INIA (Proyecto MICINN-INIA RZ2010-00003-C02) con el objeto de recuperar la población de vacas de raza bovina Murciano-Levantina (figura 5), que cuenta en la actualidad con escasos ejemplares y está

considerada en situación crítica según la Sociedad Española de Recursos Genéticos Animales (SERGA).

Las vacas donantes de esta raza se estabulan en las instalaciones de la Granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia y son punccionadas semanalmente por los especialistas del Departamento de Fisiología de dicha facultad. El



Figura 5: animales de la raza Murciano-Levantina en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de Murcia



Producción de embriones *in vitro* en el bovino

procesado *in vitro* se realiza en los laboratorios de dicho departamento (figuras 6 y 7). Finalmente, los embriones producidos, bien se vitrifican (un tipo de criopreservación especial, distinta de la congelación clásica de los embriones *in vivo* y con mejores rendimiento en los embriones *in vitro*), o se transfieren a granjas lecheras comerciales de la zona, en novillas elegidas y sincronizadas para la ocasión.



Figuras 6 y 7: realizando OPU en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de Murcia a una vaca donante de raza Murciano-Levantina

Como colofón inicial en este proyecto de conservación y recuperación de la raza Murciano-Levantina, a día de hoy, de tres embriones producidos *in vitro* tras OPU, vitrificados a día 7 de desarrollo, calentados y transferidos un mes después a novillas de raza Holstein de una granja comercial, contamos con una gestación de 40 días en el momento de entrega de este artículo. Esperamos, éste sea el inicio de una serie de gestaciones confirmadas de terneros de esta raza amenazada.

Agradecimientos

MICINN-INIA (RZ2010-00003-C02-01,-02), MICINN-FPI (BES-2010-029858). Laboratorios Fatro Ibérica S.L., Calier S.A. y Pfizer AH. D^o. A D. Juan José Belando Abellán (propietario de la granja comercial de vacuno lechero, Los Dolores, Murcia), por su trabajo, dedicación e ilusión.

Bibliografía

- Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, de Kruif A. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*. 43: 677-87. 1995.
- Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, de Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocytes complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45: 1001-14. 1996.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel ML. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 27: 147-158. 1982.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PEJ, Riesen JW, Tian X, Yang X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*. 65: 1631-48. 2006.
- Eyestone WH, First NL. Characterisation of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 35: 612-24. 1991.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55: 1341-1357. 2001.
- Herradón PG, Quintela LA, Becerra JJ, Ruibal S, Fernández M. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim*. 15: 1-8. 2007.
- Knijn H. AETE. Nacional Statistic data of the Embryo Transfer activity. 27th Scientific Meeting AETE. European Statistical data of bovine embryo transfer activity 2010. *AETE Newsletter* 34: 11-13. 2011.
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, Ruigh Ld, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59: 651-74. 2003.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM, Tavernier MA. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30: 751-62. 1988.
- Rizos D. Punción ovárica transvaginal por ecografía (OPU). XXXII Curso Internacional Reproducción Animal. INIA. Visión Libros. Madrid. 2009.
- Ruiz S. Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la Reproducción. *Cría y Salud*. 31: 58-64. 2010.
- Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod*. 62: 206-213. 2000.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM. Ovum Pick Up and *In Vitro* Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology*. 65: 914-925. 2006.

