

Factores que afectan la implementación de un programa comercial de embriones bovinos producidos *in vitro*

Parte II

Ferré, L.B. ⁽¹⁾

Resumen

En el bovino, la transferencia de embriones producidos *in vitro* ha permitido un importante progreso genético de la mano de la genómica y del semen sexado. Esto estuvo acompañado en los últimos años por un avance significativo en la eficiencia del sistema de producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos. Si bien se trata de una tecnología desarrollada hace más de veinticinco años, en la actualidad se encuentra disponible para beneficio de la producción animal. La tasa actual de embriones transferibles y la generación de preñeces por hembra donante es aceptable en términos económicos. No obstante, con un mayor y mejor entendimiento de los distintos mecanismos que gobiernan y regulan el desarrollo embrionario temprano, se podrá mejorar el éxito biológico. Se analizan cuatro importantes factores que influyen en la eficiencia global de la técnica. La hembra donante de ovocitos, el sistema de PIVE, la hembra receptora de embriones y la congelación de los embriones.

Palabras clave: desarrollo embrionario temprano *in vitro*; donante; receptora; congelación; preñez; bovino.

Factors affecting commercial application of bovine *in vitro*-derived embryo

Summary

In cattle, the *in vitro*-derived embryo transfer technique has allowed an important genetic progress along with genomic testing and sexed semen. The *in vitro* production of bovine embryos experienced significant advances in last years. Although this technique was developed twenty-five years ago, nowadays it is available for its commercial use in animal production. The current efficiency of viable embryo production and pregnancy generation per aspirated donor female is acceptable in economic terms, with a better understanding of the different mechanisms that regulate the pre-implantation embryo development; it will be possible, in the near future, to increase current biological rates. Four key factors are analyzed to increase the efficiency of the technique: oocyte donor-female, *in vitro* embryo production system, embryo recipient female and embryo freezing.

Key Words: preimplantation *in vitro* embryo development; oocyte donor; recipient; freezing; pregnancy; bovine.

(1) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Ruta 3 Km 488, Tres Arroyos (CP 7500), Buenos Aires, Argentina
Tel: +54-11968939940. E-mail: ferre.luis@inta.gob.ar

Recibido: 18 de septiembre de 2017.
Aceptado: 16 de mayo de 2018.
Taurus Año 20; N° 80: 25 - 30

Parte II

1. Receptora de embriones
 2. Congelamiento de embriones PIV
 3. Conclusiones
 4. Bibliografía
-

1. Receptora de embriones

La generación de preñeces es uno de los procesos más difíciles dentro de un programa comercial de PIVE. Los factores que más influyen en el costo final de un programa comercial de PIVE son: i) el mantenimiento de un rodeo de receptoras, ii) la cantidad de crías nacidas vivas y saludables. La realización de aspiraciones foliculares con alta frecuencia y la necesidad de transferir la mayoría de los embriones frescos requiere mantener un número importante de receptoras vacías. Esto representa un gasto importante (tal vez el más grande) dado el capital invertido en la cantidad de receptoras involucradas (entre 3 a 5 por donante aspirada), gastos de alimentación, sanitario, personal dedicado para tareas de sincronización y detección de celo, instalaciones y corrales apropiados para operar un número reducido de animales. Los resultados biológicos en términos de cantidad de embriones viables transferidos por donante y preñeces logradas por sesión de OPU, justifican o no la continuidad de un programa comercial de PIVE. Estos resultados pueden verse afectados por los índices de abortos y pérdidas perinatales por distocia.

Diversos factores pueden afectar el desempeño de la receptora en un programa de transferencia de embriones comercial. Entre ellos se pueden mencionar: raza, edad, categoría, biotipo, origen/procedencia, tiempo en el establecimiento, desarrollo, área pélvica, temperamento, estatus fisiológico y sanitario, condición corporal, balance energético, régimen de alimentación, habilidad materna, rigurosidad del examen clínico, registros de índices reproductivos, abortos, problemas de parto, factores de estrés/bienestar animal, estrategia de sincronización de celos, calidad del cuerpo lúteo, entre varios otros. La información científica publicada hasta el momento está focalizada en mayor medida en el sistema de PIVE en su conjunto (MAD, FEC y CULT), en contraste con escasa bibliografía

publicada sobre la etapa posterior (preparación de la receptora, implantación y preñez)⁽¹⁸⁰⁾.

En líneas generales, las razas británicas (Angus en particular) y sus cruza con Holando estarían en la preferencia como receptora debido a su fertilidad, dócil temperamento, habilidad materna y capacidad lechera, lo cual permitiría a la cría expresar todo su potencial genético. La edad y categoría (estado fisiológico) presenta siempre opiniones encontradas a la hora de elegir entre vaquillonas o vacas. Los que prefieren vaquillonas se basan en que generalmente tienen mejor respuesta a la sincronización y porcentajes de preñez levemente superior a las vacas. Aquellos que eligen vacas como receptoras acusan de menores problemas al parto, mayor producción de leche y habilidad materna. Generalmente se obtienen mejores resultados cuando el origen de las receptoras es del propio establecimiento, dado que no requeriría del período de adaptación y sus datos productivos, sanitarios y reproductivos serían ya conocidos. El balance nutricional (energía, proteína, vitaminas, minerales y agua) debe ser adecuado y bajo un plan integral (alimentación, sanidad y manejo) iniciado varios meses antes de iniciar un programa comercial de PIVE. Un buen indicador del estatus nutricional es la evolución de la condición corporal (CC). Los mejores resultados se obtienen cuando los valores de CC son intermedios^(215; 314). La funcionalidad del cuerpo lúteo (CL) en el momento de la implantación del embrión afecta el resultado de la anidación y por ende, la preñez final^(268; 313). La capacidad del CL por liberar suficiente progesterona favorecerá el establecimiento y mantenimiento de la preñez del embrión implantado⁽²²⁵⁾. Debido a la importancia del cuerpo lúteo en el establecimiento de la preñez, se han diseñado tratamientos de sincronización que buscan optimizar el funcionamiento del CL tratando de aumentar su tamaño o estimulando la formación de varios cuerpos lúteos acce-

sorios ^(294; 326). La categorización de la receptora basado en el tamaño y consistencia del cuerpo lúteo mediante palpación o ecografía es un procedimiento rutinario antes de transferir el embrión, sin embargo, es difícil establecer una correlación entre calidad del cuerpo lúteo y preñez ⁽¹⁴⁴⁾. Existiría un consenso general en el número de oportunidades o intentos de transferencia embrionaria a una receptora. Un máximo de tres intentos por receptora sería recomendado si las transferencias se realizaron sin inconvenientes.

2. Congelamiento de embriones PIV

El objetivo de la criopreservación de embriones es su almacenamiento a largo plazo y obtener, de manera repetible, altas tasas de supervivencia post-descongelado, altos porcentajes de implantación, preñez y nacimientos normales después de la transferencia en receptoras apropiadas ^(191; 234; 337). La criopreservación es un componente esencial de las tecnologías reproductivas aplicadas a los programas de mejoramiento genético y facilita la operatoria práctica cuando hay sobreproducción y/o cuando las receptoras no son suficientes. Los pasos para la criopreservación exitosa del embrión son: i) exposición al crioprotector, ii) enfriamiento a temperaturas bajo cero, iii) almacenamiento, iv) descongelación, v) eliminación del crioprotector y vi) regreso al estado fisiológico normal ^(231; 344). Los dos parámetros más importantes que determinan el éxito del procedimiento de criopreservación son: 1) la proporción de células embrionarias que recuperan el equilibrio en respuesta al enfriamiento, y 2) velocidad de congelación ⁽²⁰⁰⁾. La crioinjuria (o criolesión) puede ocurrir por formación de cristales de hielo intracelulares o extracelulares, toxicidad química, lesión osmótica y/o daño por fractura ⁽¹⁶¹⁾, y depende de factores tales como tamaño y forma de las células, permeabilidad de la membrana, calidad del embrión y su estadio, la especie y el origen del embrión (producido *in vivo* o *in vitro*) ⁽³³⁷⁾. Existen dos metodologías para criopreservar embriones: enfriamiento/congelamiento lento y vitrificación.

Según las estadísticas anuales de la IETS, aproximadamente el 20% del total de embriones transferidos, proviene de embriones descongelados (Tabla 3). Esto refleja el hecho de que los embriones PIV poseen una criotolerancia dismi-

nuida en comparación con sus homólogos *in vivo*. Inicialmente, la cantidad de embriones congelados transferidos era virtualmente similar a los embriones frescos. Esta situación podría estar ligada al uso del co-cultivo. En los últimos años ⁽²⁰¹⁴⁻²⁰¹⁶⁾, se observó un aumento de las transferencias de embriones congelados, posiblemente debido al uso de medios de cultivo definidos (o semi-definidos) suplementados con aditivos específicos, factores promotores de la calidad del embrión, albúmina recombinante y/o ácido hialurónico ⁽¹⁸⁵⁾, sustitutos sintéticos de suero ⁽⁷⁵⁾, como también fluidos uterinos y oviductales ⁽²¹⁶⁾. Las diferencias entre embriones PIV y los embriones *in vivo* podrían explicar la baja supervivencia de los embriones derivados *in vitro*. Entre los factores más importantes que afectan la criotolerancia podemos encontrar: (i) sistema de cultivo (formulación definida, presencia de factores de crecimiento, aditivos naturales y/o sintéticos, presencia de células somáticas heterólogas o autólogas como soporte), y (ii) medioambiente de cultivo (densidad de embriones, condiciones atmosféricas, frecuencia de cambio de medios). Las condiciones de maduración y cultivo *in vitro* subóptimas no sólo afectan morfológicamente al ovocito y al embrión, sino también fisiológicamente. El metabolismo embrionario, el contenido de lípidos del citoplasma, la velocidad de división celular, la compactación de mórulas, la expresión génica, entre otros, definirán la calidad del embrión, la competencia del desarrollo y la criotolerancia embrionaria.

La criopreservación es un componente esencial en la industria de la transferencia de embriones en el ganado bovino ⁽¹⁹⁰⁾, especialmente en estos tiempos de interacción comercial con otros mercados (“globalización”) ⁽¹⁴³⁾. El primer ternero bovino nacido derivado de un embrión *in vitro* congelado (congelación lenta) ⁽¹⁰¹⁾ no fue seguido por una adaptación de la técnica de congelación. En cambio, los primeros embriones bovinos vitrificados con éxito se publicaron a mediados de los años ochenta ⁽²³³⁾ y desde entonces, se han logrado avances significativos en el desarrollo de protocolos más sencillos, soluciones más estables y menos tóxicas, diferentes portadores de embriones y procedimientos de descongelación para lograr la transferencia directa en condiciones de campo ^(177; 335; 337).

Tabla 3. Transferencias de embriones PIV (frescos y congelados) registrados por la *International Embryo Transfer Society* en todo el mundo (IETS, http://www.iets.org/comm_data.asp).

Año	Embriones Producidos	Embriones Transferidos	Transferencias en Fresco	Transferencias de Congelados	Relación Fresco: Congelado (%)
1997	41.632	30.569	12.018	18.551	39
1998	85.026	31.327	16.269	15.058	52
2000	168.169	168.169	140.272	27.897	83
2001	109.205	30.260	15.379	14.881	51
2002	160.695	83.329	66.951	16.378	80
2003	341.748	106.220	91.372	14.848	86
2004	319.086	239.823	128.961	110.862	54
2005	330.647	265.991	183.477	82.514	69
2006	441.364	291.845	226.077	65.768	77
2007	434.581	245.257	215.512	29.745	88
2008	330.953	254.714	227.800	26.914	89
2009	376.576	305.949	283.188	22.761	93
2010	450.149	339.685	315.715	23.970	93
2011	453.471	373.869	343.927	29.942	92
2012	443.533	385.471	348.868	36.603	91
2013	517.587	393.625	358.440	35.185	91
2014	590.359	364.727	296.666	68.061	81
2015	612.709	404.173	304.946	99.227	75
2016	666.215	448.113	326.623	121.490	73
Total	6.873.705	4.763.116	3.902.461	860.655	82

El método estándar de "congelación lenta", comúnmente utilizado para la criopreservación de embriones bovinos *in vivo*, fue reemplazado por el procedimiento de vitrificación^(178; 279). A pesar de los resultados alentadores publicados recientemente, todavía hay una gran variabilidad entre los datos informados sobre la supervivencia de embriones congelados y la tasa de preñez (Tabla 4). Aunque la criopreservación de embriones PIV bovinos resulta todavía ineficiente^(191; 224; 275; 295), la preñez lograda puede resultar aceptable para laboratorios de PIVE comerciales^(229; 297). Hasta el momento, las transferencias de embriones PIV se realizan mayormente en fresco, debido a la mayor repetitividad y consistencia de los resultados^(84; 245; 276).

La baja criotolerancia de los embriones PIV podría tener su origen en el alto contenido de lípidos citoplasmáticos^(3; 48; 202; 232; 248; 259; 277; 298). La cantidad de lípidos en los embriones que fueron cultivados en medios sin suero fue similar a los homólogos *in vivo*; mientras que el contenido lipídico de embriones cultivados en medio supe-

mentado con suero, fue casi el doble en comparación con los embriones *in vivo*^(3; 89; 90). Pocas publicaciones indican lo contrario⁽²³⁾, señalando que las gotas de lípidos citoplasmáticos en los embriones no tendrían ningún efecto sobre su viabilidad después de la criopreservación.

La vitrificación puede ser una técnica de preservación más adecuada para embriones cuyo contenido de lípidos es mayor en comparación con la técnica de congelación lenta; sin embargo, los procedimientos actuales para calentamiento del embrión y el diseño del soporte donde se coloca el embrión vitrificado no son compatibles con la transferencia directa. Además, la vitrificación incluye varios pasos de equilibración antes de la inmersión en nitrógeno líquido y también post-descongelado, para lograr la remoción de los crioprotectores por dilución en múltiples etapas. Se ha intentado simplificar el procedimiento de calentamiento mediante la dilución de los crioprotectores dentro de la pajueta donde estaba vitrificado el embrión^(47; 133; 134; 149; 159; 244; 336; 338; 345); sin embargo, su aplicación en condiciones de campo es limitada.

Tabla 4. Tasas de preñez con embriones de PIV congelados producidos bajo diferentes condiciones de cultivo.

Congelamiento	Co-cultivo	Suero	Transferencia directa	Tasa preñez (%)	Referencia
Sin Congelar (Fresco)	+	+	+	42	(356)
Congelación Lenta	+	+	-	14	
Vitrificación	+	+	-	24	
Sin Congelar (Fresco)	-	-	+	73,3 ^a	(7)
Congelación Lenta	-	-	-	41 ^b	
Vitrificación	-	-	-	63 ^a	
Sin Congelar (Fresco)	-	+	+	49,1	(159)
Congelación Lenta	-	+	+	45,2	
Vitrificación	-	+	+	46,7	
Sin Congelar (Fresco)	+	+	+	51,3 ^a	(292)
Congelación Lenta	+	-	+	40,2 ^b	
Vitrificación	+	+	-	35,9 ^b	

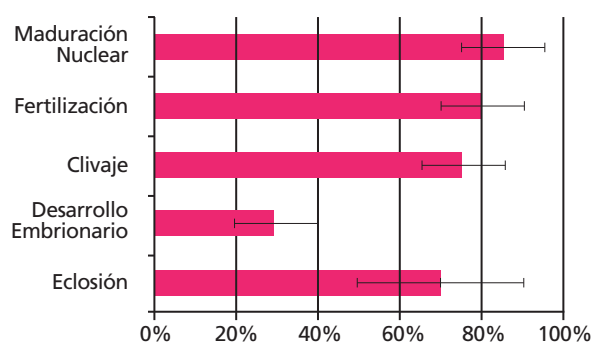
Valores con diferentes superíndices en la misma columna difieren significativamente (P<0,05)

Diversos planteos y argumentaciones se han publicado con el objetivo de explicar el porqué de la baja criotolerancia de los embriones PIV. En principio, se debería a diversos factores. La capacidad del ovocito maduro para sobrepasar las etapas tempranas (fertilización, desarrollo preimplantacional y la implantación) se denomina capacidad y es una medida de su calidad (107; 155; 187; 213; 240). Muchos factores durante el desarrollo folicular afectan la capacidad de los ovocitos, por ejemplo, el estado fisiológico y reproductivo de la hembra donante, ovocitos de folículos grandes o pequeños (85; 187; 211; 223), la salud del folículo, donde la dominancia y la atresia folicular están asociados con la capacidad ovocitaria (25; 68; 135; 147; 239), la estimulación hormonal a los folículos en desarrollo claramente mejora la competencia de los ovocitos (24; 60; 67; 69; 254; 310) y la comunicación y grado de interacción dentro del ovocito y las células del cumulus que lo rodean son necesarias para el desarrollo normal del ovocito (118; 155; 172; 270; 305). En consecuencia, el ovocito madurado *in vitro* posee una menor capacidad debido en parte a un inadecuado sistema y ambiente *in vitro* que soporte o promueva la maduración completa del ovocito (131; 172; 188; 286; 319). La Figura 1 muestra la productividad de cada etapa del proceso de PIVE. La maduración nuclear que se caracteriza por la capacidad del ovocito para reanudar la división meiótica hasta metafase II parecería tener una alta eficiencia. El desempeño del resto de los procesos o etapas de la PIVE sería significativamente menor. La mayor

pérdida en la productividad del sistema de PIVE estaría durante el período de cultivo luego de producirse el clivaje. Algunos investigadores ponen mayor énfasis en una deficiente o incompleta maduración citoplasmática (96; 119; 156). Otras evidencias parecerían indicar que el cultivo de los presuntos cigotos y embriones presenta diversas falencias y que éstas afectan el normal desarrollo de los embriones, tanto en la calidad, la criotolerancia y la expresión génica (14; 212; 253; 286).

El primer cultivo embrionario *in vitro* exitoso en mamíferos se publicó a mediados del siglo pasado (354). Desde entonces, la comunidad científica se pregunta por qué la capacidad de desarrollo durante el período de cultivo es baja en comparación con la MAD y la FEC, y desde hace bastante tiempo, estabilizada en 30-40%. Parecería haber un consenso generalizado en definir al entorno *in vitro* como "inadecuado", "estresante" y "evidentemente inferior" en comparación con su

Figura 1. Porcentaje de éxito en cada etapa de la PIVE (208; 209; 213; 310)



contraparte *in vivo*. El foco actual estaría limitado a reducir la brecha entre estos dos sistemas, aunque otras posturas sostienen que el cultivo *in vitro* de embriones no debe ser considerado como una copia imperfecta de los procedimientos *in vivo*, sino como un proceso artificial con sus propios marcos, limitaciones y posibilidades ⁽³³⁹⁾.

3. Conclusiones

La PIVE en bovinos ha mostrado un progreso significativo en los últimos años, en parte, como resultado de una mejor comprensión del potencial de la herramienta por parte de los usuarios. Otras razones obedecen al uso eficiente del semen sexado, semen caro o limitado número de pajuelas, y la selección genómica. Las principales ventajas de la técnica son un mayor número de embriones y preñeces por unidad de tiempo debido a la posibilidad de aspirar donantes con una alta frecuencia y más categorías de donantes de ovocitos. Sin embargo, también hay algunos temas no resueltos como la baja criotolerancia y otros elementos asociados a la calidad de los embriones PIV que pueden afectar la viabilidad de la preñez y al momento del parto. Estos temas están siendo abordados desde diferentes ángulos, ya sea mejorando la capacidad de desarrollo del ovocito desde su origen y/o optimizando las condiciones de cultivo. La hembra donante de ovocitos juega un papel central en el sistema de PIVE. Las condiciones sanitarias, nutricionales, manejo, bienestar animal y estrategias de sincronización y estimulación de la onda folicular, claramente afectan la capacidad del ovocito. El sistema de cultivo puede también potenciar la calidad y la viabilidad de los ovocitos y los embriones. La selección y la preparación de las receptoras de manera correcta y minuciosa ayudará a generar las preñeces deseadas. En una actividad para PIVE comercial, la disponibilidad de receptoras vacías en cantidad y calidad, es difícil y costosa. Entre los factores clave ligados a las receptoras podemos mencionar la fertilidad (ligado a la raza y la categoría), la condición corporal, el balance energético (ganancia de peso constante), la idoneidad del personal de campo sobre el manejo de las receptoras, la ejecución de protocolos para la sincronización y la detección de celo. La posibilidad de almacenar embriones PIV por tiempos prolongados representa un paso cru-

cial para las operaciones comerciales de los laboratorios dedicados a ofrecer el servicio de PIVE. Existen dos técnicas de criopreservación: la congelación por velocidad controlada (también llamada congelación lenta) y la vitrificación. Esta última, se ha convertido en los últimos años en el método de elección para los embriones PIV bovinos. Se han desarrollado diversos dispositivos para soporte de embriones y protocolos de vitrificación. Generalmente estos procedimientos de vitrificación requieren condiciones especiales para calentar los embriones, lo cual dificulta su aplicación en condiciones de campo. Para lograr consistencia en los resultados se requiere de técnicos altamente calificados y de oferta para capacitación. Pocos estudios han tratado de adaptar el método convencional de congelación de embriones PIV para transferencia directa. Todavía resta mucho por conocer sobre cómo mejorar la calidad del ovocito y el desarrollo temprano embrionario *in vitro*; su impacto en los rodeos para producción de carne y leche es reciente y posiblemente será una poderosa herramienta para mejoramiento genético.

4. Bibliografía

Debido a que el trabajo tiene 362 citas, la bibliografía puede consultarse en la web.