

# TECNOLOGIAS EMBRIONARIAS

## (2ª. Parte)

### *¿Qué se conoce sobre estas herramientas tan importantes para la reproducción?*

Debido a la información que contiene el siguiente trabajo presentado por C. Galli y G. Lazzari, del Laboratorio CIZ de Tecnologías de la Reproducción, de Cremona, Italia, y del Departamento Clínico Veterinario de la Univ. de Bolonia, Italia, en la última Conferencia Europea Holstein, sobre las técnicas existentes para aumentar la cantidad de genotipos superiores en un rodeo, lo brindamos a nuestros lectores a fin de que tengan un conocimiento sobre la evolución de la ciencia.



**Las tecnologías embrionarias son una combinación de reproducción asistida, biología celular, molecular y genómica. Tradicionalmente se las utilizan en la mejora animal para aumentar el número de genotipos superiores, pero con el avance de la biotecnología se han convertido en una herramienta para la transgénesis y el genotipado. Las tecnologías embrionarias están aquí para continuar avanzando y su uso aumentará, ya que se han hecho progresos en el conocimiento de los mecanismos que gobiernan los procesos biológicos básicos.**

#### Transferencia de embriones y descendencia

El índice de gestación con embriones de IVP (producción in vitro) puede ser muy variable. Esto está relacionado con la calidad de los embriones ya que se ve afectada tanto por el proceso de cultivo, como por los medios utilizados, la evaluación subjetiva y la selección de los embriones antes de congelarlos y/o transferirlos. Normalmente el índice de gestación es aceptable con la transferencia de embriones frescos, pero es más variable entre los laboratorios con embriones congelados. Para que la congelación sea satisfactoria, es muy importante el sistema de cultivo utilizado para desarrollar embriones. Se puede obtener el mismo índice de supervivencia de los embriones producidos in vivo cuando los embriones IVM-IVF (maduración in vitro-fertilización in vitro) se cultivan en el oviducto de ovejas. Los embriones que han crecido in vitro en SOF-BSA, que han experimentado una clara compactación en el día 5 y/o 6 desarrollan la blástula en el día 7 y se clasifican como grado 1 (de acuerdo con el manual de IETS) sobreviven bien a la congelación y la descongelación.

Por el contrario, el cultivo in vitro en presencia de suero, reduce la criotolerancia debido a la acumulación de lípidos. En este caso la vitrificación podría ser una alternativa, pero todavía no se ha puesto en práctica. Una vez que se ha producido la gestación, hay un aumento moderado de pérdidas en el primer trimestre que puede alcanzar de 10 al 12%.

Los estudios sobre el tema indican que los problemas pueden surgir en el parto. Hay informes de gestación prolongada, distocia, partos largos, aumento de mortalidad perinatal, etc.; a todo este conjunto se lo ha denominado LOS (del inglés Large Offspring Síndrome, Síndrome de Amplia Descendencia). La mayoría de los partos descritos en esos informes fueron el resultado del cocultivo con granulosa o células BRL y/o suero elevado o BSA elevado y surgido de unas cuantas transferencias llevadas a cabo

principalmente en condiciones no controladas por parte de los laboratorios de investigación. En los programas comerciales, donde las condiciones se controlan más, utilizando tanto el cultivo in vivo en el oviducto de las ovejas como el sistema SOF sin un elevado nivel de suero o BSA, más del 95% de las gestaciones son normales y se reduce la incidencia del LOS. Debido a que el uso de producción in vitro es, principalmente, para la selección intensiva de la genética más nueva, los toros que se utilizan son aquellos de los que tenemos poca información o poco precisa sobre la facilidad de parto, y esto puede ser otro factor que contribuya a los problemas de parto.

### Clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas

La tecnología de la clonación ha atraído el interés de los ganaderos durante muchos años. Al principio, cuando se utilizaba un embrión como fuente de la célula donante, no había menos lotería (genéticamente hablando), por lo que se refiere al fenotipo de las terneras resultantes, que en la selección convencional. Por esta razón y por el hecho de que sólo se podía obtener una media de 2-3 descendientes de cada embrión (un poco más de la división del siguiente embrión), la clonación de embriones realmente nunca ha entrado en el área comercial, pero se ha convertido en una herramienta de investigación. La situación cambió cuando se demostró que los núcleos de un animal adulto podían ser utilizados para clonar. Bajo tales circunstancias es posible hacer una copia de cualquier animal cuyo genotipo y fenotipo sean bien conocidos a través de la producción de leche, si es una vaca, o a través de la prueba de progenie, si es un toro.

Por estas razones, clonar células somáticas parece muy atractivo para los productores, pero la eficacia es bastante baja. Es relativamente fácil producir blastocistos partiendo del oocito obtenidos in vitro de ovarios de matadero y de los núcleos obtenidos de tejido somático del animal que se va a clonar. Ambas fuentes de blastocistos son reservas virtualmente ilimitadas. Para hacer, incluso, más simple el proceso, se puede obtener la producción de los embriones clonados sin el uso de un micromanipulador. Sin embargo, sólo un 5% de media de los blastocistos transferidos a las receptoras sobreviven a término. Es mucho menor del 40% que normalmente se alcanza con la transferencia de embriones obtenidos con la fertilización in vitro. Después de la transferencia de los embriones clonados (tanto frescos como congelados) el índice de gestación pasado el día 35 no es diferente de aquellos cuyos embriones se originan en la fertilización in vitro. Sin embargo desde el día 35 al día 60, el 60% o más de las gestaciones se pierden. A esto le sigue una pequeña pero constante pérdida de las gestaciones restantes hasta el 8º mes cuando aquellos que sobreviven llegan a término.

Las pérdidas de las gestaciones se pueden atribuir a una función defectuosa de la placenta, como se demostró por la ausencia del desarrollo del cotiledón de la fase inicial, pero después, durante la gestación, la principal causa de aborto parece ser el desarrollo de hidrops que también están asociados con la hipertrofia de la placen-

ta, cotiledones aumentados y cordón umbilical más denso. Por el contrario, el feto en la necropsia se ve relativamente normal. El elevado índice de pérdidas de gestación y por lo tanto las pérdidas de las vaquillonas receptoras, es el principal costo en el intento de clonar un animal adulto.

Una vez que la gestación ha llegado a término parece haber un retraso en la preparación de las receptoras para el parto y, como consecuencia, un retraso del mismo. Para evitar estos problemas y para reducir las posibilidades de partos difíciles, se provoca el parto administrando corticosteroides de larga duración en la última semana de la gestación. El parto tendrá lugar entre 5 y 10 días después del tratamiento en el que la receptora estará preparada y el feto ha completado la maduración de sus pulmones. En nuestra experiencia, con un manejo adecuado, la supervivencia de los terneros es muy elevada tanto para los perinatales como a largo plazo. Los informes sobre el tema se contradicen con respecto a la supervivencia y normalidad del ternero. En un análisis de la información publicada, la supervivencia media de la que se daban datos estaba en un 80%; esto es un 10, 15% más baja de lo que sería un parto normal. Una causa de posibles anomalías son las alteraciones epigenéticas que derivan de una reprogramación incompleta del núcleo somático utilizado en la clonación. Los mamíferos, sin embargo, parecen tolerar más una fuga en la impronta epigenética y en cualquier caso, en los ratones, las desviaciones epigenéticas no las hereda la progenie. Gran parte del ganado clonado ya ha alcanzado la pubertad y se ha probado que son fértiles y normales.

En el sector ganadero la clonación se puede utilizar para multiplicar animales de alto mérito genético, si son madres fundadoras de familias importantes, vacas de concurso o toros probados. Las empresas de inseminación artificial, por ejemplo, podrían encontrar un buen uso de la tecnología de la clonación para apoyar a sus negocios una vez mejorada la eficacia. Los toros más valiosos podrían ser clonados para aumentar la disponibilidad de semen en el mercado. Una política generalizada sobre el almacenaje de células somáticas de todos los toros proporcióna la posibilidad de reemplazar a toros lesionados o muertos por nuevos animales idénticos. En teoría, la tecnología de la clonación podría integrarse dentro del esquema normal de prueba de progenie y reducir los costos relacionados con la alimentación y cuidado durante 4 años, de todos los toros en prueba.

Tras la primera recolección de semen todos los toros podrían ser eliminados y luego de 4 años, cuando haya suficiente número de hijas en lactancia se podría recuperar a los mejores genotipos de las reservas congeladas de células somáticas. Otra posibilidad es hacer copias de toros probados para venderlos a los ganaderos para utilizarlos en monta natural. Estos podrían ser considerados como centros de IA de campo. Esta es una opción real para los rebaños de establecimientos extensivos, pero también en grandes rodeos de tambos intensivos, donde las condiciones de manejo dificultan una inseminación eficaz.

Entre los diferentes obstáculos a que se enfrenta esta tec-

nología, además de la biología, está el que las autoridades reguladoras la acepten. Aunque los animales clonados sean una copia genética de un animal existente, tienden a ser incluidos en la categoría de organismos modificados genéticamente, incluso si no son transgénicos o si su transgenidad se limita a tener diferente ADN mitocondrial. Las agencias reguladoras temen que las cruzadas anti biotecnológicas que se están extendiendo en Europa (y otras naciones) puedan afectar seriamente a todo el sector ganadero. Por otro lado, actualmente no hay ni política ni estrategia a seguir para la aprobación de estos nuevos productos, incluso cuando no existen riesgos de bioseguridad potenciales. La Administración de Alimentación y Drogas de EE.UU. (FDA) ha estado recopilando datos sobre animales de granja clonados y su descendencia a nivel mundial para hacer un análisis de valoración de riesgo. Los datos recogidos hasta ahora indican que ni los animales clonados ni sus productos suponen riesgo alguno para la salud humana. También hemos estado estudiando el rendimiento zootécnico y reproductivo del ganado clonado y no se encontró ninguna diferencia con los animales de control.

Un segundo nivel de discusión está en las organizaciones ganaderas. Varias asociaciones ya han aprobado la normativa para el registro de animales clonados. El número de identificación del clon es un nuevo número, ya que es diferente el individuo, pero el clon puede mantener el mismo nombre que el animal del cual es copia, seguido por



un "sufijo clon" con un número progresivo indicando cuántos clones son. Las críticas contra la clonación se basan en el temor de un aumento elevado de consanguinidad, particularmente en la raza Holstein. Sin embargo, dado el elevado nivel de consanguinidad presente en la población, esto parece una consecuencia mínima, especialmente cuando un clon simplemente reemplaza a un toro muerto o dañado.

Una segunda crítica se refiere a cómo son de idénticos los clones: el mismo genotipo en diferentes condiciones ambientales y diferente nutrición puede rendir de diferente forma, pero esto no es nada nuevo para las vacas de leche y para los animales de granja en general. Repetir la prueba de progenie para los toros clonados, como se había sugerido, no tiene demasiado sentido, a menos que el mismo tiempo también se repita la prueba al toro original, simplemente porque en 4, 5 años la población cambia y la comparación no será real. Sin embargo,

realizar una prueba de progenie simultáneamente para el toro original y su clon/es al mismo tiempo, sería un estudio interesante y útil para conseguir la aprobación del uso de clones con fines de mejora.

## Animales transgénicos

Además de en la mejora animal, la tecnología embrionaria podría encontrar su principal aplicación en la producción de animales transgénicos tanto para su aplicación agrícola como biomédica porque las modificaciones genéticas deseadas se pueden producir en las células cultivadas y el valor de un animal transgénico puede ser importante. La eficacia de esta propuesta está limitada por la eficacia de la transferencia nuclear, pero tiene gran potencial dado el posible alto valor de los animales transgénicos y de la futura mejora de la eficacia de la transferencia nuclear. Los efectos secundarios descriptos anteriormente con la transferencia nuclear junto con los problemas causados por integración aleatoria (por ejemplo: la interrupción de un gen normal debido a una integración aleatoria del gen introducido), y un control limitado de la cantidad y la especificidad del tejido de la expresión del gen aumenta el bienestar animal. Sin embargo la descendencia de los animales transgénicos heredaría la modificación genética sin sufrir los efectos secundarios de transferencia nuclear, la recombinación de homólogos que permiten la integración específica y el mejor conocimiento de la genómica funcional llevará al desarrollo de un rango más amplio de promotores específicos de tejidos que pueden ser activados o regulados por medio de estímulos externos. Las tecnologías transgénicas que van desde el enriquecimiento de genes (añadiendo copias de genes funcionales específicos de la especie) hasta rutas transgénicas de especies cruzadas, pueden llevar cambios significativos en cualquier carácter productivo. Por ejemplo, Brophy et al, introdujeron copias adicionales de genes de la caseína para producir una leche con mejor calidad de caseína y Wall et al, presentaron la lisostafina (una proteína antimicrobiana producida por una bacteria) para su expresión en las glándulas mamarias confirmando protección contra la mamitis.

## Sexado de semen

El año 2003 vio el principio de la comercialización de semen bovino sexado en Europa. Desde el punto de vista de la citometría de flujo, el semen clasificado se puede congelar en pajuelas con dos millones de espermatozoides y utilizarse para inseminar. Esta tecnología demuestra que es posible un cambio significativo del ratio por sexo en el ganado vacuno, sin embargo, aún está lejos de ser consistente en cuanto a su aplicación a gran escala, tanto en el campo técnico como económico.

La clasificación por sexo de los espermatozoides de mamíferos tiene aplicaciones para la mejora genética de animales de granja, en humanos para el control de las enfermedades ligadas al sexo y en la vida salvaje como una estrategia de manejo en cautividad y para la repoblación de especies en peligro de extinción. Se ha emprendido una investigación importante a nivel mundial sobre la

tecnología de sexado de esperma de Belstville, el único método efectivo para la pre-selección del sexo de la descendencia. La combinación de este método con las tecnologías de reproducción asistida ha dado como resultado el nacimiento de descendencia en una gran variedad de animales, incluyendo el vacuno, la única especie ganadera en la que el sexado del esperma es utilizado con fines comerciales.

Grandes mejoras en la eficacia de la clasificación, en particular del desarrollo de una clasificación de alta velocidad (15 millones de espermatozoides X e Y por hora) han sido dirigidas a la producción de descendientes utilizando dosis convencionales y bajas de inseminación artificial y a una crioconservación satisfactoria de los espermatozoides clasificados en ganado vacuno, ovinos, caballos y alces.

Una limitación importante reside en lo corta que es la vida útil del espermatozoide clasificados en el tracto genital de las hembras, siendo necesaria, en la mayoría de las especies, una deposición de esperma en el interior del útero y acercándose al tiempo de ovulación esperado, para una fertilidad aceptable tras la inseminación in vitro.

### **Células madres espermatozonales**

Recientes investigaciones en cultivos in vitro e in vivo de células madres espermatozonales han abierto una nueva posibilidad en la reproducción asistida de machos. Esta es una tecnología bastante nueva que se ha desarrollado en ratones y se ha adaptado a la ganadería. Las técnicas cubren la recolección y el cultivo in vitro de las células madres espermatozonales para después transplantarlas a los testículos de los machos receptores previamente despojados de sus células madres. El almacenaje prolongado de estas células madres espermatozonales es fiable al ofrecer la posibilidad de reconstruir en los sistemas de reparto in vivo del germoplasma de elite tras la evaluación y selección genética.

### **Problemas a resolver y perspectivas de futuro**

La tecnología para la producción de embriones como herramienta de investigación tiene un gran valor en cuestiones fundamentales sobre el control endocrino, los cambios moleculares y los procesos metabólicos que regulan el desarrollo temprano. Como tecnología aplicada, ofrece la

oportunidad de aumentar el número de descendientes de genotipos superiores. Sin embargo, para hacer que la tecnología sea más accesible para una amplia cantidad de criadores o incluso para ganaderos comerciales, hay varios aspectos que es necesario dirigir a nivel clínico, celular y molecular para aumentar la eficacia y reducir los costos que conllevan.

La técnica de recolección de óvulos tiende a ser más consistente que el MOET y permite que la producción de embriones sea segura y se pueda repetir sin interferir en el ciclo reproductor o en la producción de leche de las donantes. Sin embargo, sólo una minoría de los ovulos recogidos se desarrollan en embriones viables. Hay muchos factores con un papel importante a este respecto. El estado nutricional de la donante junto con los factores intraováricos tales como la fase del óvulo dentro de la onda folicular, probablemente esté afectando sustancialmente al desarrollo del embrión. Hay evidencia de que los óvulos recogidos en presencia de un folículo dominante son de menor calidad que los recogidos durante el crecimiento folicular. Además, diversos estudios han dejado claro que comparando la maduración in vitro con la maduración in vivo, el desarrollo potencial de los óvulos maduros in vitro es generalmente más bajo. Este descubrimiento es también una consecuencia obvia de la recolección de una población heterogénea de oocitos con diferente potencial de desarrollo, la mayoría de los cuales nunca ovularían o ya están en un estado avanzado de involución.

Los mismos autores han demostrado que la calidad de los embriones, desarrollando la maduración in vitro–fecundación in vitro, está más influenciada por las condiciones de cultivo desde el cigoto al blastocisto. Por lo tanto, la mejora en la maduración del óvulo se convierte, quizás, en el paso fundamental para aumentar la producción de embriones mientras que el cultivo de embriones es el paso que afecta a la calidad y viabilidad de éstos.

Una serie de estudios recientes ha tratado de mejorar la calidad de los óvulos imitando la última fase de crecimiento del oocito in vivo con un periodo de maduración un Vitro (24, 48 horas) antes de la maduración final. Sin embargo, todos esos estudios han fracasado al no mostrar ninguna mejora frente a los controles sin premaduración. Parece que esto limita cualquier progreso en el uso de ganado jo-

ven con el que se esperaba conseguir el mayor beneficio de ese paso de premaduración. Desde una perspectiva aplicada, sin embargo, estos resultados son muy importantes porque proporcionan un método para aumentar la flexibilidad de todos los procesos de producción de embriones in vitro permitiendo ajustes de tiempo de premaduración-maduración a las necesidades del laboratorio de fecundación in vitro o para el trabajo de clonación.

La calidad y viabilidad del embrión se ven afectadas principalmente por el sistema de cultivo que sigue a la fecundación in vitro. Esto significa que la viabilidad de un embrión producido in vitro puede variar de forma considerable de un laboratorio a otro y entre los diferentes protocolos en el mismo laboratorio. Cuando se da un sistema bueno y fiable

lación. Completar los medios de cultivo con albúmina en vez de suero, alivia este problema, pero en ambos casos la expresión de algunos genes es diferente a la de los embriones cultivados en presencia de alcohol de polivinilo. El complemento de este elemento produce embriones con forma de expresión similares a aquellos que crecen in vivo. El sistema de cultivo no sólo afecta la viabilidad de los embriones y su capacidad de congelación, sino también a las características del recién nacido.

Se demuestra que el cultivo in vitro en presencia de un alto nivel de suero o BSA puede llevar a un crecimiento significativo del peso al nacer y a la existencia de la condición compleja conocida como Síndrome de Amplia Descendencia (LOS). Un reciente estudio ha destacado muchas desviaciones celulares y moleculares du-



de cultivo in vitro o de cultivo in vivo en el oviducto de las ovejas, el índice de gestación de los embriones bovinos de maduración in vitro-fecundación in vitro, congelados-descongelados, es casi como el de los embriones producidos in vivo posteriores a la superovulación. Por lo tanto, las consiguientes mejoras de los medios de cultivo que permitan un mayor crecimiento fisiológico de los embriones, incluyendo una fase de compactación larga y clara, serán un gran beneficio. Junto a la composición química de los medios que se ha definido, juega un papel importante el tipo de macromoléculas presentes durante el cultivo. La presencia de suero se asocia normalmente a las acumulaciones de lípidos y a una escasa supervivencia después de la conge-

rante el desarrollo de preimplantación de embriones de maduración in vitro-fecundación in vitro cultivados in vitro vs in vivo. Curiosamente, este estudio ha demostrado una clara correlación entre estas desviaciones y la existencia de LOS en los terneros resultantes. Esta información será muy útil para supervisar el efecto de los diferentes medios de cultivo en el desarrollo temprano del embrión y finalmente sobre las características del ternero al nacer. Además, esto podría proporcionar criterios definidos para seleccionar sistemas de cultivos que sean más propensos a inducir el LOS y, por lo tanto, el estudio sobre los mecanismos moleculares que sustentan este síndrome. La fertilización in vitro con semen congelado es un procedimiento eficaz en bo-

vinos. Sin embargo, hay algunas situaciones en las que el uso de una inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) podría tener sus ventajas. Por ejemplo, en el caso de pocas combinaciones de padres o madre-padre, las cuales dieron como resultados una no fertilización o poliespermia masiva. El uso de semen sexado para fecundación in vitro también podría aumentar si estuviera disponible un proceso de inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) eficaz, dado que los resultados de la fecundación in vitro con semen sexado congelado-descongelado son pobres. Curiosamente mientras los resultados de ICSI bovinos no son tan consistentes y han nacido pocos terneros, esta técnica funciona bien en humanos y caballos; en realidad, está sustituyendo la fecundación in vitro en humanos, y en caballos actualmente es la única opción.

La inyección de esperma se puede ejecutar fácilmente con el uso de un manipulador piezoeléctrico y se pueden obtener altos índices de activación y formación pronuclear en varias especies. En los bovinos, sin embargo, la división y el desarrollo embrionario se retarda y reduce. Se ha estudiado el pre tratamiento de esperma, la activación de los oocitos y los métodos de inyección, pero la eficacia es baja.

La clonación de las células somáticas podría convertirse en una herramienta útil para el ganadero con fines comerciales, como lo es para la mejora genética vegetal, para garantizar la calidad, uniformidad y consistencia del producto. Para que esto ocurra se requiere una mayor eficacia y costos más bajos. Los genotipos superiores se podrían propagar mediante la clonación y combinada con la transgénesis podría ser importante para introducir los caracteres (si se identifican) relacionados con características secundarias tales como la resistencia a las enfermedades (mastitis), fertilidad, etc. Estos caracteres actualmente no se tienen en cuenta en los esquemas de selección, pero ahora están adquiriendo más importancia, en parte por motivos relacionados con el bienestar del animal. La principal barrera de esta tecnología es el alto índice de pérdida de gestación (una media del 5% de los embriones clonados llegan a término). La clonación de blastómeros puede producir pérdidas poco importantes indicando que la principal causa de pérdida es la

célula utilizada del donante. Esto verdaderamente no tiene en cuenta el tipo de célula, la fase del ciclo celular del núcleo, la técnica utilizada para la reconstrucción del embrión y el protocolo de activación. La mejora será gracias al entendimiento de los procesos biológicos básicos que surge de la reprogramación del ADN, de los mecanismos del control epigenético que dirige la expresión de los genes y probablemente de más métodos fisiológicos para inducir la activación de embriones.

Se esperan mejoras en estos temas, no sólo en la supervivencia de los embriones clonados, sino también en la reducción de algunos de los problemas descritos en las gestaciones avanzadas y en algunos partos.

El genotipo de los embriones es otra herramienta que se podría utilizar en los programas de selección. Junto al sexado de animales mediante el uso de esperma sexado, ya que se están utilizando propuestas para la indentificación de los portadores de embriones de enfermedades genéticas como BLAD, y se extenderá a la CVM y otras. Otra posibilidad que se está estudiando actualmente es chequear para loci de valor genético. Debido a la poca cantidad de ADN disponible a partir de una biopsia embrionaria (normalmente 5, 8 células), es necesario tener un proceso fiable de amplificación total del ADN y así chequear los loci de interés

## Conclusiones

Las tecnologías embrionarias aplicadas a la genética animal juegan el papel importante de aumentar el impacto de los genotipos superiores en la población. Sin embargo, se requiere un uso más amplio y competente de las técnicas disponibles para alcanzar el mayor beneficio en su aplicación.

Se esperan avances en el futuro, vinculados a la nueva era de investigación tal como la clonación somática y genotipación de embriones para encontrar su papel en la mejora animal avanzada.

Además de la continua evolución científica, también la necesidad de implicar a los productores y consumidores en las nuevas biotecnologías. A este respecto, es necesario un mayor conocimiento para demostrar la seguridad de biotecnologías embrionarias y la idoneidad de los productos derivados para entrar en la cadena alimentaria. 