

Capítulo LXVII

Factores que afectan la sobrevivencia post-natal de becerros productos de fecundación *in vitro*

Rumualdo González Fernández

La tecnología de producción *in vitro* de embriones (PIVE) adquiere cada día una mayor demanda comercial particularmente en las ganaderías cebuínas debido al mayor rendimiento en la producción de embriones, en relación con las razas lecheras. Sin embargo, a pesar de la amplia utilización de esta biotecnología, existen algunos problemas que superar como son una tasa ligeramente menor de preñez y una mayor incidencia de abortos, distocias y mortalidad peri-natal en relación con el uso de embriones *in vitro* (Hasler, 2000).

A nivel de laboratorio, los embriones son producidos de forma rutinaria después de haber cumplido las tres etapas sucesivas de manipulación del proceso de producción, que incluyen la maduración *in vitro* (MIV) de los oocitos, capacitación espermática y fecundación *in vitro* (IVF) de los oocitos madurados y finalmente, el cultivo *in vitro* (IVC) de los oocitos fecundados hasta alcanzar el estado de blastocisto.

Los procedimientos actuales utilizados para producir embriones *in vitro* requieren todavía de un considerable proceso de mejoramiento. El desarrollo de embriones *in vitro* está fuertemente influenciado por los eventos que ocurren durante la maduración (IVM), fecundación (IVF) y el subsecuente desarrollo de los embriones (IVC).

MALFORMACIONES PERINATALES EN CRÍAS PRODUCTO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*

Es conocido, que la manipulación de embriones en condiciones ambientales, no fisiológicas, causan perturbaciones en el posterior desarrollo del *conceptus* (Jacobsen *et al.*, 2000; Rooke *et al.*, 2007). Uno de estos trastornos comúnmente observado ha sido el síndrome del ternero grande (STG). Otras anomalías incluyen un periodo prolongado de gestación, incremento de abortos, distocias, nacimiento de terneros débiles, con dificultades respiratorias, mayor incidencia de muertes perinatales y aumento del tamaño de ciertos órganos (corazón, hígado y riñones). También, se han observado alteraciones a nivel de la placenta como edema, hidroalantoide, cotiledones en un menor número y con un tamaño aumentado y una disminución del contacto feto-mater-

nal. Algunas anomalías esqueléticas y la persistencia del uraco también han sido registrados en terneros producto de fecundación *in vitro* (Young *et al.*, 1998; Farin *et al.*, 2001; Constant *et al.*, 2006).

Una alta incidencia de pérdidas tempranas fetales después de la transferencia de embriones PIVE ha sido reportada por muchos laboratorios. Se ha observado que la mayor causa de pérdidas fetales se presenta durante el primer trimestre de gestación (Hasler, 2000), lo cual ha sido atribuido a malformaciones en el desarrollo de la membrana alantoidea. Estas malformaciones de la membrana están asociadas a una insuficiencia placentaria la cual sería la causa principal de las muertes fetales después de la transferencia de embriones (PIVE). Dichas pérdidas son consecuencia de un pobre suministro de nutrientes placentarios, así como de la inhabilidad de la membrana para remover los desechos tóxicos de nitrógeno que tienden a ocasionar la muerte embrionaria (Peterson & McMillan, 1998).

INFLUENCIA DE SUPLEMENTOS EN EL MEDIO DE CULTIVO Y SU RELACIÓN CON ALTERACIONES CONGÉNITAS

Es importante considerar que las condiciones de cultivo determinan la morfología embrionaria y la expresión de los genes (Enright *et al.*, 2000; Rizos *et al.*, 2002). Algunos estudios han demostrado, que la adición del suero fetal bovino (SFB) al medio de cultivo *in vitro* podría incrementar la incidencia del STG. Un factor presente en el suero que pudiera estar relacionado con este problema es la concentración de amoníaco. La suplementación de urea en la alimentación incrementó la concentración de amoníaco en la sangre, la cual afectó el desarrollo de los embriones (McEvoy *et al.*, 1997; Sinclair *et al.*, 1998). La restricción del suero durante las primeras 72 horas de cultivo *in vitro* no se acompañó de una disminución en la incidencia de abortos, distocias o problemas congénitos (Hasler, 2000).

En apariencia, un bajo porcentaje de 2,5% de suero inactivado al medio de cultivo de los embriones no mostró efecto sobre la incidencia de las alteraciones congénitas. Una observaciones mostraron que los embriones PIVE cultivados en un medio químicamente definido (MQD), sin suero, tuvieron una elevada tasa de sobrevivencia, siendo superior después de la congelación (descongelación y luego cultivo) que la de los embriones cultivados en MQD con 10% de suero fetal, con medias de 84,9 vs 60,2%, respectivamente (Barcelo-Fimbres & Seidel, 2007). Algo similar se observó en embriones cultivados en medio suplementado con suero y Phenazine Ethosulfate (PES) o L-Carnitina (LC), sustancias que reducen la producción y acumulación de lípidos en los embriones PIVE (Ghanem *et al.*, 2014). Embriones Brahman y Jersey PIVE mostraron un gran contenido de lípidos, lo que disminuye la sobrevivencia y la subsiguiente preñez después de la criopreservación comparada con embriones no congelados (Ballard *et al.*, 2006; Pryor *et al.*, 2007).

MANEJO Y CUIDADO DE LAS CRÍAS (PIVE)

Debido a la frecuente incidencia de gestaciones prolongadas en receptoras preñadas con embriones PIVE, es importante comenzar a monitorear la evolución del proceso de gestación, a partir de los siete meses de gestación. La duración del periodo

de gestación para novillas receptoras mestizas (cebú × razas lecheras) sería aproximadamente 282 días para embriones mestizos y 292 días para embriones Brahman y Gyr (Bavera, 2000). Dos semanas antes de la fecha prevista del parto, las receptoras deberán estar sometidas a una vigilancia más estrecha y en particular, durante las horas nocturnas. La inducción del parto utilizando la combinación de dexametasona-prostaglandina $F_{2\alpha}$ estaría justificada, cuando para la fecha prevista del parto, no se observan signos clínicos evidentes de un próximo parto. El parto comúnmente tendría lugar entre 12-24h post-tratamiento.

Las crías producto de PIVE, en general, resultan más débiles que las de transferencia de embriones *in vivo* o de servicio natural. Es importante implementar la atención veterinaria para mejorar el acto de amamantamiento, completar la nutrición inicial con el suministro de dos litros de calostro (previamente congelado) durante las tres horas de nacido, así como la hidratación de las crías que muestran señales marcadas de desnutrición al nacimiento. Igualmente, no se debe olvidar la práctica de curetaje del ombligo con solución de yodo (7%), dedicando una mayor atención a aquellos terneros que nacen con la anomalía congénita del engrosamiento del cordón umbilical y persistencia del uraco. Otra recomendación para reforzar indirectamente la inmunidad de las crías, sería vacunar a las receptoras 1-2 meses antes del parto, especialmente contra enfermedades virales como IBR, DVB, causantes de enfermedades respiratorias y diarreas en los recién nacidos.

CONCLUSIONES

A pesar de los problemas asociados con las alteraciones perinatales en las crías, producto de PIVE, esta tecnología continua desarrollándose en pro del mejoramiento ganadero al utilizar con más eficiencia el potencial genético y reproductivo de las donadoras élite y el uso de semen proveniente de toros superiores para la fecundación *in vitro*. De igual manera, se continúan realizando amplias investigaciones con el fin de perfeccionar la técnica de producción de embriones, utilizando medios de cultivo óptimos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bavera GA. 2000. Preñez y tabla de Gestación. Curso de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC.
- Barcelo-Fimbres M, Seidel GE Jr. 2007. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulphate and either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 74 (1): 395-404.
- Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. 2006. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydroallantois. *Biol Reprod* 75: 122-130.
- Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54: 659-673.
- Farin PW, Crosier AE, Farin CE. 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55: 151-170.

- Ghanem N, Fakruzzaman A-Na Ha, Bang Jae-Il, Lee Sang-Chan, Kong Il-Keun. 2014. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology* 82: 238-250.
- Hasler JF. 2000. *In vitro* production of cattle embryos: problems with pregnancies and partition. *Human Reproduction* 15 (Suppl 5): 47-58.
- Jacobsen H, Schmidt M, Holm P, Sangild PT, Vajta G, Greve T, Callesen H. 2000. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from *in vitro* produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. *Theriogenology* 53: 1761-1769.
- McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS. 1997. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim Reprod Sci* 47: 71-90.
- Pryor JH, Looney CR, Walker D, Seidel JGE, Hasler JF, Kraemer DC, Romo S. 2007. Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of *in vivo* embryos from Brahman cattle. *Reprod Fertil Dev* 19: 224-225.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61: 234-248.
- Rooke JA, McEvoy TG, Ashworth CJ, Robinson JJ, Wilmot I, Young LE, Sinclair KD. 2007. Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction. *Theriogenology* 67: 639-647.
- Sinclair KD, McEvoy TG, Carolan C, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmot I, Robinson JJ, Broadbent PJ. 1998. Conceptus growth and development following *in vitro* culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. *Theriogenology* 49: 71-90.
- Young LE, Sinclair KD, Wilmot I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3: 155-163.