

## CAPÍTULO XXXVI

### LA FERTILIZACION *IN VITRO* COMO HERRAMIENTA EN EL MEJORAMIENTO DE LA GANADERIA DOBLE PROPÓSITO

- I. INTRODUCCIÓN: Medios Químicamente Definidos
- II. TÉCNICA DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO* (FIV)
- III. LIMITACIONES
- IV. POTENCIALES USOS DENTRO DE LA GANADERÍA DOBLE PROPÓSITO
- V. CONCLUSIONES
- VI. LITERATURA CITADA

## I. INTRODUCCIÓN: Medios Químicamente Definidos

La fertilización *in vitro* (FIV) ha mostrado importantes avances desde el nacimiento de "Virgil" (primer becerro producto de FIV) en 1981 [3]. Entre dichos avances se encuentra el desarrollo de medios de FIV que permiten la producción de embriones bajo condiciones químicamente definidas, en ausencia de productos de origen biológico como el suero [12]. La utilización de suero y células (co-cultivo) como componentes de los medios usados en los sistemas de FIV ha sido considerada como beneficiosa y en muchos casos hasta indispensable para una eficiente producción *in vitro* de embriones [4]. Estos componentes podrían proporcionar nutrientes, eliminar factores embriotóxicos o simplemente modular favorablemente el microambiente que rodea al embrión. En todo caso la utilización de suero y co-cultivo normalmente se asocia a un crecimiento más acelerado y a una mayor proporción de oocitos fertilizados que alcanzan el estadio de blastocito [7, 8].

Sin embargo, el suero y co-cultivo agregan al medio factores desconocidos, sobre los cuales no poseemos control alguno, además de representar posibles fuentes de agentes infecciosos. Han sido realizados importantes esfuerzos para eliminar paulatinamente los componentes de origen biológico de los medios de maduración de gametos, fertilización y cultivo de embriones. En la actualidad, es posible producir embriones bovinos bajo condiciones químicamente definidas, donde todos los componentes químicos son totalmente conocidos y puros (químicamente sintetizados o producto de la tecnología de recombinación del ADN). La transferencia de embriones FIV producidos bajo condiciones químicamente definidas ha producido crías viables [11].

Actualmente gran número de embriones bovinos son producidos semanalmente *in vitro* en diversos laboratorios alrededor del mundo con amplios fines de investigación. La mayoría de estos laboratorios aun dependen de la utilización de suero, albúmina sérica bovina o co-cultivo en sus sistemas FIV para la producción de embriones. No obstante, un número importante de estos embriones no son transferidos a hembras receptoras, por lo cual medimos su capacidad de desarrollo y calidad sobre la base de parámetros indirectos como: aspecto morfológico, grado de desarrollo, número de células, resistencia a la congelación, proporción de células apoptóticas, entre otros.

Es importante que la producción *in vitro* de embriones se oriente cada vez más en los próximos años hacia la utilización de condiciones definidas. Ello garantizaría un mayor control sobre agentes infecciosos presentes en los componentes de origen biológico actualmente utilizados en la elaboración de medios en sistemas FIV. La adopción de medios químicamente definidos igualmente permitiría obtener resultados de mayor repetibilidad, ofreciendo a los investigadores sistemas libres de intervenciones de elementos desconocidos presentes en componentes de origen biológico. Estos esfuerzos han de ser complementados por la evaluación *in vivo* (transferencia a receptoras) de los embriones producidos bajo condiciones definidas de cultivo [11]. La evaluación *in vivo* de la capacidad de sobrevivencia embrionaria nos daría una idea más clara y directa de la capacidad de desarrollo y calidad de los embriones FIV.

El presente Capítulo pretende ofrecer al lector la información que le permita adquirir una idea más clara sobre el proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos, alguno de los obstáculos que limitan su aplicación a nivel comercial y sus potenciales usos dentro de la ganadería doble propósito.

## II. TÉCNICA DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO* (FIV)

La FIV puede ser dividida en tres etapas bien diferenciadas:

- Maduración *in vitro* (MIV) de oocitos
- Fertilización *in vitro* (FIV) propiamente dicha
- Cultivo *in vitro* (CIV) de embriones.

La MIV busca propiciar la progresión del oocito primario o inmaduro (bloqueado en profase de la primera división meiótica) hacia un oocito secundario o maduro (metafase de la segunda división meiótica). Los oocitos inmaduros son obtenidos a través de la aspiración de folículos (generalmente con un diámetro entre 2 a 8 mm) presentes en la superficie de ovarios de animales sacrificados o aspirados por vía transvaginal (ovum pick-up) de animales vivos. Generalmente se seleccionan oocitos rodeados por múltiples capas compactas de células del cumulus, con un citoplasma homogéneo, uniformemente granuloso y claro.

Los oocitos seleccionados son generalmente colocados en un medio de maduración e incubados durante 24 horas en un ambiente de alta humedad, 5% de CO<sub>2</sub> y protegidos de la luz. El medio de maduración es un medio complejo, por lo general basado en el uso de TCM-199 (Medio de Cultivo Tisular 199) [10, 11]. Una vez transcurridas 24 horas de la MIV, los oocitos maduros, en metafase de la segunda división meiótica (MII) están preparados para ser fertilizados.

La FIV propiamente dicha utiliza espermatozoides móviles y viables provenientes de semen fresco o congelado. La obtención de dichos espermatozoides implica que estos deben ser separados de aquellos espermatozoides inmóviles y muertos presentes en el semen. Existen diversos métodos utilizados para la separación de espermatozoides viables. Entre los más populares se encuentran el swim-up (nadar hacia arriba) y la separación por gradientes. El swim-up se basa en la habilidad de los espermatozoides móviles en nadar hacia la parte superior de una columna de un medio apropiado, separándose así de aquellos espermatozoides inmóviles que permanecen en el fondo del tubo. La separación por gradientes (ejemplo: gradientes de Percoll) se basa en la diferencia de peso entre los espermatozoides vivos y los muertos. Al ser centrifugado por algunos minutos el semen en presencia de este gradiente, los espermatozoides vivos serán separados de los muertos al ubicarse a diferentes niveles del gradiente.

Una vez que se ha logrado obtener una población de espermatozoides viables, estos serán inducidos a sufrir el fenómeno de capacitación espermática. Este proceso es inducido *in vitro* exponiendo a los espermatozoides a soluciones hipertónicas, ionóforos de Ca<sup>2+</sup>, cafeína o heparina, entre otros. La exposición a soluciones de heparina, es uno de las alternativas más utilizadas actualmente para lograr la capacitación espermática *in vitro*. Una vez inducida la capacitación de los espermatozoides, estos son co-

locados en el medio de fertilización (ejemplo: mDM, TALP) en presencia de los oocitos madurados por un periodo de 6 a 24 horas en un ambiente de alta humedad, 5% de CO<sub>2</sub> y protegidos de la luz [10, 11]. Una vez terminado el proceso de FIV, los presuntos cigotos son transferidos a un medio de cultivo embrionario para comenzar el CIV de embriones (última etapa del proceso de FIV). El CIV procura proveer al embrión con las condiciones necesarias para propiciar una continua división celular, la formación del blastocito y el normal desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocito.

Durante el CIV, es importante que los medios de cultivo utilizados (ejemplo: SOF) se adapten a los cambios metabólicos y nutricionales que los embriones experimentan en la medida que avanzan en su desarrollo. En nuestro laboratorio, se utilizan tres diferentes medios de cultivo embrionario que difieren en la concentración de compuestos como glucosa, glutamina y citrato. Estas variaciones en su composición buscan adaptarse a las necesidades y a las vías metabólicas utilizadas de preferencia por los diferentes estadios embrionarios. La transferencia sucesiva de embriones de un medio a otro cada 48 a 72 horas, permite además contrarrestar la acumulación excesiva de tóxicos en el medio de cultivo. El CIV tiene una duración total de 6 a 8 días, en un ambiente de elevada humedad, 5% de CO<sub>2</sub> y protegidos de la luz [10, 11]. Luego de 6-8 días en cultivo, entre 20 y 40% de los oocitos seleccionados alcanzan el estadio de blastocito.

### III. LIMITACIONES

La FIV sólo podrá ser ampliamente aplicada en beneficio del productor, si demuestra ser una tecnología eficiente, adaptable a las necesidades del productor y cuyo producto genere beneficios que justifiquen los costos de su aplicación. Con porcentajes de división celular después de la fertilización que alcanzan hoy día cifras al 80% y que alrededor de 35 a 40% de oocitos seleccionados alcanzando el estadio de blastocito [4], podemos decir que, la FIV ha demostrado ser una técnica bastante eficiente. Sin embargo, la aplicación comercial de la técnica no se ha producido en gran escala a pesar del importante progreso alcanzado en los últimos 20 años [9]. A esta situación han contribuido limitantes relacionadas básicamente con la calidad de los embriones producto de FIV [4]. Entre estas limitantes se encuentran:

1. *Baja sobrevivencia embrionaria.* Los embriones FIV se han caracterizado por poseer una baja sobrevivencia luego de su transferencia a hembras receptoras. En los mejores escenarios su tasa de sobrevivencia pocas veces supera el 40%, comparado con un 50 a 60% en el caso de embriones producidos *in vivo* (superovulación) [9].
2. *Baja resistencia a la congelación.* Al compararse con embriones producidos *in vivo*, los embriones FIV muestran una inferior resistencia a la congelación. La tasa de re-expansion y viabilidad luego de la descongelación es inferior a aquella mostrada por embriones producidos *in vivo* [14].
3. *Alta tasa de abortos y anomalías congénitas.* Las tasas de abortos en gestaciones de embriones FIV supera significativamente aquella de embriones *in vivo* [6]. Se han reportado niveles de abortos de hasta 50% luego de la transferencia de embriones FIV a vacas receptoras [1, 15]. Embriones FIV con frecuencia dan origen a fetos de gran peso y tamaño. Este fenómeno conocido como el síndrome del becerro

grande (Large calf syndrome) ha estado constantemente asociado a la producción *in vitro* de embriones, especialmente en rumiantes. Este mayor tamaño de los fetos aparece desde muy temprano en la gestación [5]; en algunos casos se ha atribuido su origen a la exposición de los embriones a componentes del suero o co-cultivos utilizados con frecuencia en los medios de cultivo. Igualmente asociado a embriones FIV se han señalado problemas de distocia, los cuales junto con los pesos excesivos al nacimiento provocan una alta tasa de mortalidad perinatal. Entre las anomalías asociadas con fetos producto de la transferencia de embriones FIV se encuentran necrosis muscular múltiple, enteritis, neumonías e hipoplasia cerebelar [16].

Se ha señalado que la inferior calidad de los embriones FIV (reflejada en las limitantes señaladas anteriormente) son producto de una expresión genética alterada por las condiciones *in vitro* en las que son producidos estos embriones. De tal manera que nuestros esfuerzos deben dirigirse a optimizar las condiciones de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* con el fin de incrementar la calidad de los embriones producidos. Esfuerzos en este sentido han utilizado la incorporación a los medios de sistemas *in vitro* de agentes reductores de radicales libres de oxígeno, medios químicamente definidos y factores de crecimiento, entre otros.

#### IV. USOS POTENCIALES DENTRO DE LA GANADERIA DOBLE PROPÓSITO

La FIV ha encontrado diversos campos de aplicación y sus técnicas han sido utilizadas total o parcialmente en la obtención de crías de vacas que ya no responden a los tratamientos superovulatorios o animales valiosos que perecen repentinamente. La FIV también ha asistido en la producción de animales transgénicos y clones.

Quizás una de las aplicaciones potencialmente más importantes de la FIV es la utilización de ovarios de animales sacrificados para la producción de grandes números de embriones de valor comercial. Al compararse el número total de embriones obtenidos y el número de embriones congelables se concluyó que la producción *in vitro* de embriones era tan eficiente como la obtención de embriones por métodos *in vivo* (por superovulación); sin embargo, el costo por embrión era mucho más bajo en el caso de la FIV [13]. También se ha comparado la producción *in vivo* de embriones con la producción *in vitro* de embriones, concluyendo que cuando el objetivo es obtener un número determinado de gestaciones de un sexo determinado en un corto periodo de tiempo, la FIV es mucho más eficiente [2]. En este último estudio, a pesar de una mayor tasa de mortalidad embrionaria, el número de gestaciones donde el feto era una hembra fue tres veces más alto que el de machos, cuando se utilizó la FIV que cuando se utilizó la superovulación.

Bajos costos de inversión y personal, así como una comprobada eficiencia hacen de la FIV una tecnología que está en condiciones para ser aplicada a gran escala a nivel comercial. Experiencias comerciales previas han confirmado la eficiencia de la técnica al reportar tasas de fertilización de 75.6% y tasas de desarrollo de blastocitos de 28.9% [13]. A pesar de las limitaciones enumeradas en la sección anterior es importante destacar que esfuerzos comerciales a gran escala (2268 embriones FIV transferi-

dos), utilizando embriones FIV frescos del día 7, han resultado en tasas de preñez que superan el 50% [9]. Estos resultados sirven de justificación a aquellos esfuerzos que buscan aprovechar las ventajas ofrecidas por la FIV para la producción comercial de ganado bovino.

En el año 2000, se inició un convenio de colaboración entre universidades y empresas de los Estados Unidos de América y Venezuela, cuyo objetivo principal era entre otros, propiciar la implementación de un programa FIV para la producción de animales mestizos F1 (Brahman x Holstein) en Venezuela. Ovarios de vacas Holstein sacrificadas en Carolina del Sur (U.S.A.) eran transportados al laboratorio de fertilización *in vitro* de la Universidad de Georgia (Georgia, U.S.A.), donde se llevaba a cabo todo el proceso de fertilización *in vitro* utilizando semen congelado de toros Brahman, además de la congelación de los embriones resultantes. Los embriones congelados eran transportados a Venezuela donde eran transferidos (transferencia directa) por técnicos de la Universidad del Zulia (Maracaibo, Venezuela) y VIATECA (Villa del Rosario, Venezuela). Hasta la fecha se han realizado más de 400 transferencias embrionarias a novillas receptoras. Los resultados de estas experiencias nos han permitido concluir que la transferencia de embriones FIV producidos en medios de composición químicamente definida (sin compuestos de origen biológico) arroja bajas tasas de preñez (alrededor de un 10%). Aun la adición de diversos factores de crecimiento (ejemplo: IGF-I, EGF, LIF) no logran incrementar significativamente dichas tasas de preñez. Solo la adición de suero al medio de cultivo embrionario y la transferencia de dos embriones por receptora logran aumentar la tasa de preñez a niveles comercialmente viables (entre 35 y 55%).

No se han observado prolongaciones significativas de la duración de la gestación. A pesar de que se ha presentado una mayor incidencia de abortos en especial, entre el tercer y quinto mes de gestación, no se han observado anomalías congénitas. Las gestaciones que llegan a término resultan en partos normales. No se ha reportado el nacimiento de crías débiles, siendo su crecimiento y desarrollo normal.

## V. CONCLUSIONES

La FIV ofrece potencial para en un futuro cercano imponerse como la tecnología de preferencia en el área de la producción comercial de ganado bovino. Su comprobada eficiencia y la posibilidad de combinarse con otras tecnologías (ejemplo: sexaje de semen, sexaje embrionario) la ubican en un lugar preferencial. Sin embargo, es necesario optimizar medios químicamente definidos que nos permitan mejorar la calidad de los embriones producidos *in vitro*.

## VI. LITERATURA CITADA

- [1] Agca, Y., Monson, R.L., Northey, D.L., Peschel, D.E., Schaefer, D.M., Rutledge, J.J. 1998. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* 50:129-145.
- [2] Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N. 1999. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51:59-70.

- [3] Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.L. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27:147-158.
- [4] Brackett, B.G., Zuelke, K.A. 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 39:43-64.
- [5] Farin, P.W., Farin, C.E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of Reproduction* 52:676-682.
- [6] Gandolfi, F., Moor, R.M. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reproduction and Fertility* 81:23-28.
- [7] Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F.A., Boland, M.P., Pintado, B., de la Fuente, J. 2001. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ration of bovine embryos. *Theriogenology* 55:1117-1126.
- [8] Hasler, J.F. 2000. In vitro culture of bovine embryos in Menezes's B2 medium with or without coculture and serum: the normality of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science* 60-61:81-91.
- [9] Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E., Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-152.
- [10] Hernandez H. 2001. Fertilización in vitro. En: *Reproducción Bovina*. C. Gonzalez-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI: 411-426.
- [11] Hernandez-Fonseca, H.J., Sirisathien, S., Bosch, P., Cho, H.S., Lott, J.D., Hawkins, L.L., Hollet, R.B., Coley, S.L., Brackett, B.G. 2002. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media. *Animal Reproduction Science* 69:151-158.
- [12] Keskinetepe, L., Burnley, C.A., Brackett, B.G. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biology of Reproduction* 52:1410-1417.
- [13] Lu, K.H., Polge, C. 1992. A summary of two-year's results in large scale in vitro bovine embryo production. *Proceedings 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction* 3:1315-1317.
- [14] Minami, N., Bavister, B.D., Iritani, A. 1988. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. *Gamete Research* 19:235-240.
- [15] Reichenbach, H.D., Liebrich, J., Berg, U., Berm, J. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *J. Reproduction and Fertility* 95:363-370.
- [16] Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J., Sulon, J., Hansen, H.B. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 46:527-539.