



Estado actual de los sistemas de producción de embriones en ganado bovino

CARMEN DÍEZ MONFORTE. Área de Genética y Reproducción. Centro de Biotecnología Animal (CBA). SERIDA (Gijón, España). mcdiez@serida.org

MARTA MUÑOZ LLAMOSAS. Área de Genética y Reproducción. Centro de Biotecnología Animal (CBA). SERIDA (Gijón, España). mmunoz@serida.org

JOSÉ NÉSTOR CAAMAÑO GUALDONI. Área de Genética y Reproducción. Centro de Biotecnología Animal (CBA). SERIDA (Gijón, España). jncaamano@serida.org

ENRIQUE GÓMEZ PIÑEIRO. Área de Genética y Reproducción. Centro de Biotecnología Animal (CBA). SERIDA (Gijón, España). egomez@serida.org



Instalaciones del Centro de Biotecnología Animal del SERIDA (Deva, Gijón): Unidad de Reproducción Asistida.



La producción de embriones en ganado bovino permite acelerar la mejora genética de las explotaciones de forma más rápida que la inseminación artificial (IA). En la actualidad existen dos sistemas de producción de embriones: la producción de embriones *in vivo*, a través de la multiovulación y transferencia de embriones (MOET), y la producción de embriones *in vitro*. Ambas técnicas permiten incrementar la intensidad de selección de los programas de mejora al hacer posible que un reducido número de hembras donantes, pero de alta calidad genética, produzca un elevado número de descendientes por unidad de tiempo; además, las hembras de menor calidad se pueden

aprovechar como receptoras para los embriones producidos. El uso de estas técnicas en combinación con semen sexado permite seleccionar el sexo de la descendencia con una eficacia del 90%. El presente trabajo analiza estos dos sistemas de producción de embriones en ganado bovino, sus indicaciones, y las ventajas e inconvenientes de su aplicación.

Producción de embriones *in vivo*: tecnología MOET

Desarrollada a partir del inicio de los 70, está basada en la superestimulación





Instalaciones del Centro de Biotecnología Animal del SERIDA (Deva, Gijón): Laboratorio de producción de embriones *in vitro*.



del ovario para provocar una ovulación múltiple en las hembras donantes (en lugar de la ovulación sencilla que tiene lugar de forma natural). Las hembras se inseminan y los embriones se desarrollan en el útero de la donante hasta que se recogen por medio de un lavado uterino (flushing) que se suele realizar en el día 7 (Machaty *et al.*, 2012). Los embriones recogidos pueden transferirse a hembras receptoras que llevarán la gestación a término, o someterse a procesos de conservación a bajas temperaturas, conocidos genéricamente como criopreservación, para ser utilizados con posterioridad. De estos procesos, la congelación se estima como más adecuada para los embriones producidos enteramente en el animal vivo. Inicialmente, tanto los procedimientos de recogida como la transferencia de los embriones se realizaban de forma quirúrgica, pero desde los años 80 se usan procedimientos más simples de lavado uterino y transferencia no quirúrgicos (vía transcervical), lo que ha permitido la difusión de la técnica.

En Europa, durante el año 2011, se realizaron 23.480 lavados uterinos, de los que se obtuvieron 192.418 embriones, un 56,5% transferibles. El 93% del total de embriones de bovinos transferi-

dos en ese periodo se obtuvieron por esta técnica (AETE, 2012).

Producción de embriones *in vitro*

Esta técnica permite producir embriones a partir de ovocitos que se fecundan (FIV) y cultivan *in vitro* durante un periodo de 7 días, momento en que los embriones viables se transfieren a hembras receptoras o se criopreservan (por congelación o por vitrificación; la vitrificación es recomendable para este tipo de embriones) (Galli *et al.*, 2001; Machaty *et al.*, 2012). Desarrollada durante los años 70 a partir de ovocitos obtenidos de ovarios recogidos en el matadero, la FIV dio lugar en 1981 al nacimiento del primer ternero producido *in vitro*. El desarrollo de sistemas de punción transvaginal guiada por ecografía (Ovum Pick-Up -OPU-) permite hoy en día obtener ovocitos de hembras donantes vivas, los cuales, una vez fecundados y cultivados *in vitro* (OPU-FIV), dan lugar a embriones transferibles a receptoras. La OPU-FIV puede realizarse regularmente y con mayor frecuencia que la producción de embriones por MOET. La Tabla 1 refleja los datos de actividad OPU-FIV comercial desarrollada en Europa durante el año 2011.



País	Sesiones OPU	Ovocitos recuperados	Embriones transferibles	Embriones transferibles/sesión OPU
Francia	265	2.208	524	2,0
Alemania	1.012	4.564	3.217	3,2
Italia	168	2.434	423	2,5
Holanda	3.530	28.678	3.814	1,1
Total	4.975	37.884	7.978	2,2

Aunque ampliamente instaurada en algunos países, la OPU-FIV está en continua evolución. Técnicamente, el desarrollo de la OPU-FIV se ha centrado en estandarizar el material y equipos necesarios para la punción ovárica y mejorar los protocolos de producción de embriones en el laboratorio (maduración, fecundación y cultivo). Los aspectos biológicos se han centrado en el análisis de la respuesta individual de las donantes, la periodicidad de la recogida, o la conveniencia de la estimulación hormonal y los protocolos de elección (van Wangtendonk-de Leeuw, 2006).

Ventajas e inconvenientes de las técnicas MOET y OPU-FIV

A pesar de las grandes expectativas generadas y de su buena implantación en las explotaciones bovinas, el rendimiento de las técnicas MOET se encuentra relativamente estancado. El número de embriones transferibles obtenidos por lavado oscila en torno a 5 (4,6 en 2011; AETE, 2012) y apenas ha experimentado variaciones en los últimos 15 años. A este hecho se suma el que las hembras necesitan tener una edad mínima para el inicio de los tratamientos, la falta de respuesta de algunas hembras a la superovulación, la necesidad de fijar periodos de descanso entre dos tratamientos de superovulación y la falta de resultados en casos concretos de infertilidad (problemas ginecológicos, infertilidad del macho, etc).

Por su parte, la OPU-FIV presenta las ventajas de que se puede obtener un mayor número de crías por unidad de tiempo a partir de una misma donante, y que la tecnología no depende del estado reproductivo de la donante. Así, se pue-

den recoger ovocitos de hembras jóvenes que no han alcanzado la pubertad, y de hembras preñadas durante los 3 primeros meses de gestación (Galli *et al.*, 2001; Abreu-Machado *et al.*, 2006; van Wangtendonk-de Leeuw, 2006).

La aplicación de tratamientos hormonales es imprescindible en el caso de la tecnología MOET, y optativo en el caso de la OPU-FIV. En el caso de la técnica MOET el objetivo es producir el mayor número de embriones viables, mientras que en la OPU-FIV se busca incrementar el número de ovocitos a partir de los cuales se producirán embriones *in vitro*. La reducida vida media y otras características de los productos hormonales que se emplean para estimular el ovario, hacen que la dosis y la pauta de administración influyan de forma significativa en los resultados. De esta manera, diferentes estudios han demostrado que la superestimulación ovárica afecta a la calidad de los embriones recogidos (Machaty *et al.*, 2012), mejora la capacidad del ovocito para completar su maduración, y aumenta los porcentajes de desarrollo hasta blastocis-

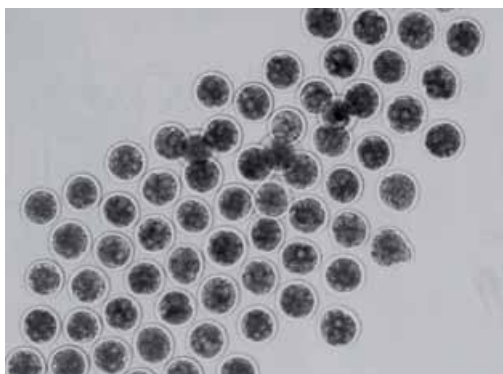
←
Tabla 1.-Producción de embriones bovinos *in vitro* a partir de ovocitos obtenidos por OPU en Europa durante el año 2011 (AETE, 2012).

↓
Instalaciones del Centro de Biotecnología Animal del SERIDA (Deva, Gijón): Laboratorio de micromanipulación.





Embriones (día 2 de desarrollo) producidos tras fecundación *in vitro* de ovocitos obtenidos por punción de ovarios de hembras sacrificadas.



to (estadio de elección para la transferencia o criopreservación en el caso de este tipo de embriones producidos *in vitro*).

El hecho de que el tratamiento hormonal no sea imprescindible en la OPU-FIV, supone una ventaja económica y de manejo frente al MOET. Aunque en la OPU-FIV la superestimulación ovárica puede incrementar el número de embriones transferibles producidos por sesión, el número total de embriones producido por donante puede no aumentar en términos absolutos, debido a los diferentes regímenes de punción; así, si hay tratamiento hormonal se realizan 1 ó 2 punciones quincenales, mientras que si no lo hay las hembras son sometidas a punción dos veces por semana durante un periodo de hasta dos meses, sin que la fertilidad de la hembra donante se vea afectada. Otra posibilidad es la de alternar sesiones de OPU con y sin superestimulación en la misma semana.

La OPU-FIV permite optimizar el semen, ya que con una misma dosis se pueden fecundar ovocitos recogidos de diferentes donantes el mismo día. Además, la OPU-FIV permite que ovocitos procedentes de una sesión de aspiración de una donante puedan fecundarse con semen de toros diferentes, lo que incrementa la variabilidad genética. Con la tecnología MOET se precisan 2 ó 3 IA por tratamiento y la producción de crías de padres diferentes a partir de un único ciclo de superovulación se complicaría, al requerirse la IA con dosis de diferentes toros, convirtiéndose en un proceso de resultados impredecibles.

Si se opta por usar semen sexado (para producir crías de sexo conocido), el por-

centaje de embriones viables recuperados por flushing (MOET) disminuye debido a su menor fertilidad con relación al semen no sexado convencional y al menor número de espermatozoides/ pajuela, de forma que el número de pajuelas de semen utilizadas aumenta (5-6 pajuelas por colecta; Fuentes *et al.*, 2013). La OPU-FIV es la herramienta de elección para incrementar las tasas de fecundidad del semen sexado, puesto que permite reducir el número de espermatozoides necesarios para fecundar los ovocitos.

El uso de la tecnología OPU-FIV tiene además especial interés en aquellas hembras con problemas de infertilidad, repetidoras, con afectación del tracto reproductivo (obstrucciones oviductales), o sin respuesta a los tratamientos de superovulación (Galli *et al.*, 2001).

Aunque la OPU-FIV puede presentar ventajas sobre la tecnología MOET en términos de número de crías producidos por unidad de tiempo (IA: 1 ternero/año; MOET: 20-25 terneros/año; OPU-FIV: 80-100 terneros/año; van Wangtendonk-de Leeuw *et al.*, 2000; van Wangtendonk-de Leeuw, 2006), hay que considerar que esta tecnología produce embriones con porcentajes de gestación ligeramente más bajos que los embriones producidos *in vivo* (van Wangtendonk-de Leeuw, 2006; Lonergan, 2007; Rizos *et al.*, 2008). Así, los embriones producidos *in vivo* (MOET) pueden dar lugar a índices de gestación de entre el 70 y 80 % tras su transferencia en fresco y del 50% en el caso de los embriones congelados (Korhonen *et al.*, 2012). Por su parte, los embriones producidos *in vitro* y transferidos frescos permiten obtener tasas de preñez del 60% (datos propios no publicados), porcentaje que se reduce al 43% cuando los embriones son vitrificados (Trigal *et al.*, 2012). En este sentido, el conocimiento de cómo afecta el periodo de cultivo a la calidad de los embriones, a los índices de gestación, a la frecuencia de abortos y a la normalidad de los terneros nacidos es materia de numerosos estudios en los que el grupo de Genética y Reproducción del CBA se encuentra muy implicado, a través del desarrollo de proyectos de investigación en el campo de las biotecnologías reproductivas.



También es importante destacar que los costes de producción de un embrión por la técnica OPU-FIV son más elevados que los generados por la tecnología MOET (Van Wangtendonk-de Leeuw, 2006). Finalmente, aunque la punción de las donantes puede realizarse en las propias explotaciones por veterinarios cualificados equipados con ecógrafo y sistema de punción/aspiración, se requieren laboratorios y personal especializado para culminar el proceso de producción y criopreservación de embriones *in vitro*.

Conclusiones

Las tecnologías MOET y OPU-FIV están plenamente desarrolladas y ampliamente instauradas en el marco de la mejora genética de la cabaña ganadera bovina. Aunque la complejidad de la OPU-FIV y quizás razones económicas restringen todavía su aplicación a gran escala en nuestro país, esta tecnología contribuye en muchos países a la mejora genética de las explotaciones. Así, en países como Brasil su uso es mayoritario frente al MOET, hecho posiblemente relacionado con el mayor peso del ganado de la subespecie *Bos indicus* (cebú), cuya dinámica folicular permite la recuperación de mayor cantidad de ovocitos que en el caso del ganado vacuno predominante en Europa, que proviene de *Bos taurus* (Pontes *et al.*, 2012).

El Centro de Biotecnología Animal del SERIDA dispone de personal cualificado y del equipamiento necesario para la obtención de los ovocitos por OPU, y para realizar todo el proceso de producción de embriones *in vitro* en el laboratorio. Los proyectos de investigación desarrollados por el Área de Genética y Reproducción Animal del SERIDA han dado lugar a mejoras significativas en los sistemas de cultivo, de la criopreservación y de la predicción de la viabilidad de los embriones que ya se han utilizado en el campo asturiano.

Agradecimientos

E. Correia (MICIN) S. Carrocera, D. Martín. RTA2011-0090, FEDER.

Referencias bibliográficas

- ABREU-MACHADO S., REICHENBACH H.D., WEPPERT M., WOLF E., DIAS GONÇALVES P. The variability of ovum pick up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. *Theriogenology* 2006 65: 573-583.
- AETE. National Statistic Data of the Embryo Transfer activity. *28th Scientific Meeting of the AETE*, Saint-Malo (France), September, 2012:43-54.
- TRIGAL B., GÓMEZ E., CAAMAÑO J.N., MUÑOZ M., MORENO J., CARROCERA S., MARTÍN D., Díez C. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2012 78: 1465-1475.
- FUENTES S., LIÉBANA E., DE LA FUENTE J. Embryo response of superovulated Holstein heifers inseminated with X-sorted frozen sperm. *Reprod. Fert. Dev.* 2013 25: pp 225.
- GALLI C., CROTTI G., NOTARI C., TURINI P., DUCHI R., LAZZARI G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 2001 55: 1341-1357.
- KORHONEN K., JULKUNEN H., KANANEN K., BREDBACKA P., TIIRIKKA T., RÄTY M., VARTIA K., KAIMIO I., KONTINEN A., HALMEKYTÖ M., VILKKI J., PEIPPO J., LINDBERG H. The effect of ascorbic acid during biopsy and cryopreservation on viability of bovine embryos produced *in vivo*. *Theriogenology* 2012 Jan 1;77(1):201-5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.07.034.
- LONERGAN P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc Reprod Fertil (Suppl)* 2007 64:315-325.
- MACHATY Z., PEIPPO J., PETER A. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology* 2012 78: 937-950.
- PONTES JH, MELO STERZA FA, BASSO AC, FERREIRA CR, SANCHES BV, RUBIN KC, SENEDA MM. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 2011 Jun;75(9):1640-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.026. Epub 2011 Feb 18.
- RIZOS D., CLEMENTE M., BERMEJO-ÁLVAREZ, P., DE LA FUENTE, J., LONERGAN, P., GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Dom Anim* 2008 43 (Supl. 4): 44-50.
- VAN WANGTENDONK-DE LEEUW A. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 2006 65: 914-925.
- VAN WANGTENDONK-DE LEEUW A., MULLAART E., DE ROOS A., MERTON J., DEN DAAS J., KEMP B., DE RUIGH L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 2000 53: 575-597. ■

