

BIOTECNOLOGIAS EMBRIONARIAS EN PRODUCCION BOVINA

José L. Estrada L., MV., MSc., PhD.*

RESUMEN

La biotecnología ofrece herramientas muy poderosas en el campo de los embriones, siendo éste un aspecto fundamental en el mejoramiento genético de los animales. La transferencia de embriones y la obtención de una cantidad de terneros superior al conseguido naturalmente, ha abierto un sinnúmero de posibilidades tanto de aplicación de esta tecnología, como del desarrollo de investigación para hacer que ella tenga una mayor difusión en la medida en que se multiplique el material original, se consiga mantenerlo por tiempo indefinido o se reduzcan los costos. En este sentido, se ha generado conocimiento en congelación de embriones, maduración y fertilización de oocitos bajo condiciones **in vitro**, bisección y clonaje de embriones, sexaje de embriones y producción de animales transgénicos, en donde se han alcanzado avances significativos no sólo en investigación, sino en su aplicación a nivel comercial.

Palabras Claves Adicionales: Embrión, bovinos, biotecnología, micro-manipulación embrionaria.

ABSTRACT

EMBRYO BIOTECHNOLOGIES APPLIED TO LIVESTOCK

Biotechnology is a powerful tool in the embryo field, being a fundamental aspect in animal livestock. Embryo transfer and the production of a number of calves higher than that obtained by the natural way, have open a huge amount of opportunities not only for the application of this technology,

* Programa de Biotecnología Animal, CORPOICA-CEISA. Avenida Eldorado No. 42-42. Bogotá, D.C.

but also for development of research. This is a very useful technique with wide utilization based on the multiplication of the original material, criopreservation of germplasm to keep it for a long period of time or reducing costs of its application. In this way, it has been obtained knowledge on embryo freezing, *in vitro* oocyte maturation and fertilization, embryo bisection and cloning, embryo sexing and transgenesis. Significant advances have already been gotten not only in research but also in commercial application of this technologies.

Additional Index Words: Embryo, bovine, biotechnology, embryo micromanipulation.

Con la ampliación de la utilización de la transferencia de embriones (TE) y la necesidad de una mayor cobertura y mejor explotación de sus bondades, científicos de todo el mundo han estado trabajando en el desarrollo de nuevas metodologías que hagan de la TE una técnica de mayor eficiencia en los programas de mejoramiento genético, especialmente en bovinos. A continuación se mencionan algunas de las metodologías sobre las cuales se está trabajando en la actualidad, con el propósito de hacer de la TE una tecnología más utilizable en explotaciones bovinas, particularmente de tipo comercial.

CONGELACION DE EMBRIONES

La congelación de embriones se presenta como una gran alternativa en la aplicación de la TE para superar algunas de las limitaciones más importantes como son: la disponibilidad de hembras receptoras suficientes para recibir el número posible de embriones obtenidos de la superovulación de la vaca donante, el transporte de embriones entre localidades bastante separadas o entre países y el mantenimiento de los embriones por un período largo de tiempo, sin que su viabilidad se vea afectada. Para satisfacer estas necesidades, es necesario inducir una supresión de las actividades enzimáticas, lo cual se consigue solamente a temperaturas muy inferiores a cero. La temperatura de nitrógeno líquido (-196°C) ha resultado ser el mejor sistema para la conservación de embriones por muy largos períodos de tiempo. Cuatro aspectos se deben tener en cuenta para obtener una congelación exitosa de embriones (Leibo y Loskutoff, 1993).

a) Las células deben ser protegidas por una sustancia no tóxica que reduzca el riesgo de la deshidratación y de la formación de cristales dentro de la célula, durante la congelación y la descongelación del embrión. El glicerol (Tabla 1)

TABLA 1
Tasa de supervivencia y desarrollo de embriones bovinos
congelados en PEM suplementado con glicerol.

Tratamiento	No. de embriones	Desarrollo a 48 h. (%)	Desarrollo a 72 h. (%)
Glicerol solo	24	76.1	47.6
Glicerol + SN + BSA	19	73.7	52.6
Glicerol + SN	22	63.6	59

SN = Suero de novillo.
 Adaptado de Peláez et al. (1995).

ha sido la sustancia de elección para esta función, especialmente en bovinos (Bouyssou y Chupin, 1982), mientras el etilen glicol lo es en ovinos (Cocero et al., 1988).

b) Debe ejercerse un cuidadoso control de las fases de congelación para evitar que se formen cristales de agua que son letales para la célula. En este caso se utiliza un sistema manual o automático de inducción de cristalización a una temperatura entre -6 y -7°C.

c) Los embriones deben ser calentados a temperaturas fisiológicas para adquirir su función normal.

d) El crioprotector debe ser removido de los embriones por dilución.

Con base en los resultados, ya de por sí buenos desde el punto de vista biológico, científicos de todo el mundo han orientado sus investigaciones hacia procesos mucho más sencillos, en términos de su aplicación a nivel de campo y de los costos tanto de los reactivos como de los equipos que se utilicen. En este sentido se trabaja en el diseño de equipos más sencillos, de menor consumo de nitrógeno y de fácil transporte para trabajo en campo, y en la evaluación de diferentes crioprotectores que permitan hacer una congelación con descenso rápido de la temperatura (Szell y Shelton, 1986). De estas evaluaciones se ha pasado a la aplicación de una de las tecnologías más modernas en la congelación de especímenes vivos, la vitrificación, que consiste en la utilización de altas concentraciones de crioprotectores combinados, lo cual permite hacer descensos rápidos de temperatura sin afectar la supervivencia de los embriones (Papis et al., 1995).

Dentro de este mismo propósito tecnológico, actualmente se trabaja con gran intensidad en el desarrollo de esquemas de congelación de oocitos y de embriones provenientes de programas de fertilización *in vitro*. La Tabla 2 muestra algunos de los resultados obtenidos por Hasler *et al.* (1995), en los cuales se demuestra cómo, aunque con tasas inferiores de preñez, la posibilidad biológica de congelar embriones provenientes de FIV está dada y muchos grupos de investigación están adelantando proyectos en esta área.

Embrión	Edad (días)	Número	% de preñez
FIV fresco	7	1884	56
FIV fresco	8	362	43
FIV fresco	9	22	41
FIV congelado	7	67	42
FIV congelado	8	30	20
<i>In vivo</i> fresco	7	320	76
<i>In vivo</i> congelado	7	325	67

FIV = Fertilización *in vitro*.
Adaptado de Hasler *et al.* (1995).

FERTILIZACION *IN VITRO* (FIV)

La fertilización *in vitro*, que significa producción de embriones bajo condiciones estrictamente de laboratorio, fue vista inicialmente como un mecanismo para ampliar el conocimiento de los eventos fisiológicos que ocurren alrededor de la fertilización. Posteriormente, con base en otros desarrollos de la biotecnología embrionaria, se encontró que la FIV era, en algunos casos, un paso obligado y en otros, un factor de mucha importancia para la producción animal. Así, vemos que dentro de los procesos de transferencia de genes y transferencia de núcleos, el estado ideal en el cual se han obtenido los mejores resultados ha sido el de oocitos madurados o embriones de una célula. En otros casos, ya a nivel comercial, se están utilizando los embriones provenientes de fertilización *in vitro* para inducir preñeces gemelares, transfiriendo embriones baratos en vacas previamente inseminadas y para acelerar

la producción de embriones de terneras o novillas como medio para disminuir el intervalo generacional.

Dentro del proceso de la FIV, es necesario tener en cuenta tres factores estrechamente interrelacionados, de los cuales depende el éxito del proceso:

a) **Maduración de los oocitos.** Mediante este proceso los oocitos colectados, ya sea de ovarios de matadero (Leibfried-Rutledge et al., 1987) o de animales vivos por aspiración con ayuda del ultrasonido, son cultivados en un medio de maduración, suplementado con gonadotropinas (LH, FSH), factores de crecimiento (IGF-I, EGF) y hormonas esteroides (estradiol) (Keefer, 1995). En este medio, los embriones permanecen durante 24 h a 39°C y con una tensión de CO₂ del 5% (Estrada y Peña, 1995).

b) **Capacitación de los espermatozoides.** Para la FIV se requiere una metodología adecuada que mantenga la supervivencia de los espermatozoides y les permita alcanzar la capacidad para penetrar y fertilizar el oocito. Varios métodos han sido utilizados, comenzando por la capacitación inducida *in vivo* en los tractos reproductivos de las hembras y su posterior recolección, hasta los actuales estrictamente *in vitro* con base en medios preparados a nivel de laboratorio. Uno de los sistemas más empleados es el descrito por Gordon (1989), basado en un medio Tyroide (TALP) modificado con la adición de BSA, lactato de sodio y piruvato de sodio y un pH que está entre 7.4 y 7.8, según la especie (Lu et al., 1987).

Un importante paso de este proceso de preparación espermática envuelve el lavado de los espermatozoides por centrifugación en dos ocasiones, después de un procedimiento de swim-up (nadado hacia arriba). Posteriormente, los espermatozoides son expuestos a un medio que contiene entre 0.2 y 1.0 ul/ml de heparina por unos 15 min antes de utilizarlos para la inseminación. La concentración final en el medio de fertilización debe ser un millón de espermatozoides por ml. (Parrish et al., 1986).

c) **Fertilización.** El objetivo de esta parte del proceso es el de simular las condiciones que se encuentran en el tracto reproductivo de la hembra, durante la fertilización *in vivo*. Con tal fin, los oocitos maduros son colocados en microgotas de medio de cultivo, generalmente un medio TALP adicionado de BSA o FCS y Hepes (Brackett y Zuelke, 1993), a los cuales se les agregan los espermatozoides previamente capacitados a una concentración de 10⁶ espermatozoides/ml (Ling y Lu, 1990). Como en el caso de la maduración, los oocitos se cultivan por 18-24 h a 39°C, con una tensión de CO₂ del 5%.

Una vez conseguida la fertilización de los embriones, éstos deben ser cultivados bajo condiciones que garanticen la superación del bloqueo en el desarrollo, que se presenta cuando los embriones bovinos cultivados *in vitro* alcanzan el estado de ocho células. Para superar este bloqueo, se han diseñado diferentes modelos de cultivo que van desde la transferencia a úteros de hembras nodrizas de otras especies, hasta el cocultivo en células y últimamente en medios sintéticos (Liu *et al.*, 1995).

BISECCION EMBRIONARIA

Con esta técnica se busca que mediante la micromanipulación de los embriones en estado de mórula o blastocisto, se puedan obtener dos mitades con autonomía para continuar su desarrollo independiente y producir con cada una de ellas un individuo que, en este caso, sería gemelar. Comercialmente, se está empleando esta tecnología para la producción de un mayor número de embriones, o como paso dentro de la aplicación de otras tecnologías embrionarias como el sexaje y la identificación temprana de genes.

Hasta el momento, la técnica clásica es la de cortar mecánicamente los embriones en estado de mórula o blastocisto, lo que se ha logrado hacer, inicialmente, con la ayuda de equipo sofisticado y ahora, mediante sistemas más sencillos, constando de solamente una pipeta de soporte y una cuchilla montados en micromanipuladores, y con la ayuda de un estereoscopio o un microscopio invertido (Chupin, 1989).

En la actualidad, grupos de investigadores se encuentran trabajando en el mejoramiento y simplificación de la técnica con el uso o no de zona pelúcida, estado de desarrollo embrionario, calidad de los embriones donantes (Arave *et al.*, 1987), congelación de los hemi-embryones, medios de cultivo y sistemas de corte de los embriones (Williams y Moore, 1988). Algunos resultados obtenidos por Sunagawa *et al.* (1994) se presentan en la Tabla 3.

CLONAJE DE BLASTOMERAS

Otra manera de multiplicar el número de embriones provenientes de un solo embrión es mediante el cultivo de blastómeras individuales y su desarrollo a estados avanzados de mórula o blastocisto. En la Tabla 4 se muestran algunos datos de preñeces, obtenidos como producto del cultivo de blastómeras individuales.

TABLA 3
Tasa de concepción de embriones enteros y hemi-embriónes bovinos sometidos a congelación.

Tipo de embrión	No. embriones transferidos	Preñeces obtenidas (%)
Hemi-embrión	51	21 (41.2)
	14 ^a	8 (57.1)
Embrión intacto	55	23 (41.8)

^a Una mitad fue utilizada para pruebas diagnósticas.
Tomado de Sunagawa et al. (1994).

TABLA 4
Tasas de preñez y supervivencia fetal después de la transferencia de embriones micromanipulados.

Tipo de embrión	No. de preñeces (%)	No. de fetos (%)	No. de preñeces gemelares (%)
IVt 1/4	3/15 (20)a	7/30 (17)a	2/3 (67)a
IVt 3/8	4/14 (36)ab	7/28 (25)ab	2/5 (40)a
IVt hemi	7/14 (50)ab	10/28 (36)ab	3/7 (43)a
Ivv hemi	11/20 (55)ab	7/20 (35)b	5/11 (45)a

Adaptado de Loskutoff et al. (1993).

a,b: Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

IVt: *In vitro*.

Ivv: *In vivo*.

De la Tabla anterior se pueden deducir las ventajas de esta metodología, en términos de las preñeces alcanzadas a partir de un embrión no sólo en preñeces simples, sino como gestaciones y partos gemelares.

TRANSFERENCIA DE NUCLEOS

Este procedimiento consiste en la utilización de núcleos de embriones tempranos para producir un mayor número de embriones. Lo que se hace, entonces, es transferir el núcleo de un embrión temprano (8-64 células) al citoplasma de un oocito maduro y permitir que éste alcance su desarrollo, teniendo como base la composición genética del núcleo donante. Los resultados obtenidos con esta metodología muestran su viabilidad biológica, llegán-

dose a obtener hasta cerca de un 40% de desarrollo con núcleos de embriones de 8 a 16 células (Robl y Stice, 1989).

SEXAJE DE EMBRIONES

La capacidad para predecir el sexo de la futura cría ha sido una de las alternativas que han querido manejar los genetistas, como parte de sus programas de mejoramiento genético. Inicialmente, la tendencia de la investigación estuvo dada hacia el sexaje de los espermatozoides, separando los X de los Y. Sin embargo, dadas las bajas tasas de éxito obtenidas, se buscó la alternativa que ofrecían los embriones. Los primeros trabajos fueron realizados con base en la determinación de corpúsculos de Barr, mediante tinciones de cariotipos e identificación del antígeno HY. Hoy, con la ayuda de los desarrollos en biología molecular y el perfeccionamiento de las técnicas de micromanipulación embrionaria, se ha dado un vuelco significativo en la investigación en este campo. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar las secuencias del ADN del cromosoma Y ha sido utilizada con gran eficiencia en el sexaje de embriones a partir de una sola blastómera (Gordon, 1989). Los resultados en cuanto a eficiencia, utilizando estas técnicas, se acercan al 100%, lo cual hace augurar que su aplicación se dará en un muy corto plazo.

ANIMALES TRANSGENICOS

El desarrollo del ADN recombinante ha permitido a los científicos aislar genes simples, analizar y modificar sus estructuras de nucleótidos, hacer copias de estos genes y, finalmente, transferir las copias de esos genes aislados. Un animal que integra ADN recombinante es llamado "transgénico" y el gene como tal se conoce como "transgene" (Pursel y Rexroad, 1993). Existen varios métodos para transferir genes en mamíferos. Ellos son:

- a) Microinyección de pronúcleos.
- b) Inserción por retrovirus.
- c) Inserción de células madres (stem cells).
- d) Espermatozoides como vectores.

Los genes más utilizados en estos experimentos, en las diferentes especies, han sido: hormona del crecimiento, factor de liberación de la hormona del crecimiento, factor insulínico de crecimiento I, inmunoglobulinas A y G y alfa y beta globina, entre otros (Wall, 1996).

La Tabla 5 muestra algunos de los resultados obtenidos hasta el momento, en cuanto al éxito alcanzado en la transferencia de genes en mamíferos.

TABLA 5
Eficiencia en la producción de animales transgénicos.

Especie	No. de experimentos	No. de embriones inyectados	% de embriones nacidos	% de embriones transgénicos	% de embriones expresando ¹
Bovina	9	1397	16.2	0.79	—
Caprina	1	203	14.3	0.99	100
Ovina	10	5242	10.6	0.88	46.3
Porcina	20	19397	9.9	0.91	52.3

Adaptado de Pursel y Rexroad (1993).
¹ Que producen la proteína de interés.

Los datos anteriores muestran los pobres resultados obtenidos con esta tecnología, en la cual es necesario desarrollar trabajos más amplios tanto en la metodología de transferencia como en los mecanismos de control y de expresión de los genes.

Wall (1996) reporta que debido a la baja tasa de eficiencia, el costo de un ternero transgénico estaría por el orden de los US\$500.000.00, basado en un cálculo con oocitos obtenidos de animales superovulados. Estos costos podrían reducirse a cerca de una tercera parte, si se emplean oocitos provenientes de ovarios de matadero. A pesar de los altos costos debido a la ineficiencia del proceso, las herramientas para la transferencia de genes están a la mano y son muchos los grupos de investigadores que en la actualidad están trabajando para tratar de superar los puntos en donde la tecnología se encuentra bloqueada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Arave, C. W.; Bunch, T. O.; Michelsen, C. H.; Warnik, K.** 1987. Factors affecting survivability of transgenic whole and demi-embryos in a commercial dairy herd. *Theriogenology*, **28**: 373-382.
2. **Bouyssou, B.; Chupin, D.** 1982. Two step freezing of cattle blastocysts with dimethyl sulfoxide (DMSO) or glycerol. *Theriogenology*. **17**: 159-164.
3. **Brackett, B.; Zuelke, K.** 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, **39**: 43-64.
4. **Chupin, D.** 1989. Efficiency limits and use of embryo transfer in domestic animals. Work shop in biotechnology. FAO. Pekin, oct. 9-13 30 p.
5. **Cocero, M. J.; Procureur, R.; De La Fuente, J.; Chupin, D.** 1988. Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. *Theriogenology*, **29**: 238.
6. **Estrada, L.; Peña, M. A.** 1995. Maduración y fertilización *in vitro* de oocitos bovinos. Protocolo. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. Programa Nacional de Biotecnología Animal. (Mim.) 22 p.
7. **Gordon, I.** 1989. Large-scale production of cattle embryos by *in vitro* culture methods. *Ag Biotech News and Information*, **1**: 345-348.
8. **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.
9. **Keefer, C. L.** 1995. Update on bovine *in vitro* embryo production. *Embryo Transfer Newsletter*. **13**: 8-12.
10. **Leibfried-Rutledge, M. L.; Critser, E. S.; Eyestone, W. H.; Northey, D. L.; First, N. L.** 1987. Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* **36**: 376-383.
11. **Leibo, S. P.; Loskutoff, N. M.** 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, **39**: 81-94.
12. **Ling, Z. J.; K. H. Lu.** 1990. Frequency of cleavage and development *in vitro* of bovine oocytes fertilized in different number in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*. **33**: 275.

13. Liu, Z.; Foote, R. H.; Yang, X. 1995. Development of early bovine embryos in co-culture with KSOM and taurine, superoxide dismutase or insulin. *Theriogenology*, **44**: 741-750.
14. Loskutoff, N. M.; Johnson, W. H.; Betteridge, K. J. 1993. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology*, **39**: 95-107.
15. Lu, K. H.; Gordon, I.; Gallagher, M.; McGovern, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Veterinary Record*, **121**: 259-260.
16. Palasz, A. T.; Tornesi, M. B.; Archer, J.; Mapletoft. 1995. Media alternatives for the collection, culture and freezing of mouse and cattle embryos. *Theriogenology*, **44**: 705-714.
17. Papis K.; Avery, B.; Holm, B.; Callesen, H.; Greeve, T. 1995. The effect of vitrification solution, equilibration time, and direct dilution method on survivability of equilibrated or vitrified bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology*, **43**: 293 (Abst).
18. Parrish, J. J.; Susko-Parrish, J.; Leibfried-Rutledge, M. L.; Critser, E. S.; Eyestone, W. H.; First, N. L. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, **25**: 591-600.
19. Pursel, V. G.; Rexroad, C. E. Jr. 1993. Status of research with transgenic farm animals. *J. Anim. Sci.* **71** (suppl. 3): 10-19.
20. Robl, J. M.; Stice, S. L. 1989. Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology*, **31**: 75-84.
21. Sunagawa, M.; Kurosawa, I.; Kasahara, T.; Watanabe, T.; Takahashi, M.; Horisawa, J. 1994. Direct transfer of bovine frozen-thawed demi-embryos. *Theriogenology*, **41**: 306.
22. Szell, A.; Shelton, J. N. 1986. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, **68**: 699-703.
23. Wall, R. J. 1996. Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology* **45**: 57-68.
24. Williams, T. J.; Moore, L. 1988. Quick-splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, **29**: 477-484.