

Artículo original:

FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO EN BOVINOS

Factors affecting the *in vitro* production of bovine embryos

S. Miguez-González, F. Zandonadi-Machado, P. Alvares-Lunardelli, L. Simões Rafagnin-Marinho, M. Marcondes-Seneda

Departamento de Clínicas Veterinárias -
Universidade Estadual de Londrina, Londrina,
Paraná, Brasil

86051-990 Fone (43) 3371-4064 fax (43)
3371-4063

Email:
mseneda@uel.br

Palabras Clave:
Embrión, bovino, *in vitro*

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) gradualmente se ha incorporado en programas de reproducción con el objetivo de mejoramiento genético (Viana *et al.*, 2012). Las tasas de producción de embriones se vuelven cada vez más prometedoras, gracias a las nuevas biotecnologías que resultan en una mayor precisión en la manipulación de los gametos durante el proceso *in vitro*.

En los últimos años, la PIVE en Brasil adquirió gran relevancia a nivel mundial. Actualmente, Brasil es considerado el primer país del mundo en número de embriones producidos *in vitro*. En el último recuento de la IETS (2012), Brasil producía cerca de 270.000 embriones, lo que corresponde a casi el 80% de la producción mundial. Esta importancia es sin duda relacionada con el predominio de animales *Bos indicus* en el rebaño, que representan aproximadamente 80% del ganado brasileño (Pontes *et al.*, 2010)

Para la efectuaración de la PIVE es necesaria la recuperación de ovocitos, que se puede lograr por aspiración folicular *in vivo* (OPU; Bols *et al.*, 2004) vía transvaginal, o por la recuperación de los ovocitos derivados de ovarios de mataderos. Ovocitos recuperados son sometidos a la maduración (MIV), la fertilización (FIV) y el cultivo *in vitro* de embriones (CIV) en condiciones controladas de laboratorio (Nandi *et al.*, 2006).

Animales de la raza Nelore (*Bos indicus*) son considerados como responsables de elevar el nivel de Brasil en relación con la producción *in vitro* de embriones (PIVE). Estos animales tienen una peculiaridad en relación con otras razas: una mayor cantidad de ovocitos recuperados de una sesión de OPU (Seneda *et al.*, 2002), llegando a producir cuatro veces más en comparación con los ovocitos de *Bos taurus*.

La PIVE ha traído muchos avances y la apertura de nuevas vías para programas de reproducción. Permite, por ejemplo, el uso de terneras prepúberes, vacas en principio de gestación, vacas seniles y hembras con subfertilidad (Rumpf, 2007).

Con la perspectiva de multiplicar con rapidez los animales de alto valor genético, hace unos cinco años los productores de leche comenzaron a hacer un mayor uso de las técnicas de OPU / PIVE. En resumen, la PIVE no ha sido utilizada más solamente para los animales élite, y se ha convertido en una alternativa para mejorar las tasas de preñez y acelerar el mejoramiento genético de forma comercialmente viable. Por lo tanto, el uso de embriones bovinos para generar embarazos ha proporcionado beneficios directos a los productores de leche y de carne de diferentes escalas (micro, pequeña, mediana y grande). El objetivo de este trabajo es presentar y discutir los principales factores que afectan a la producción *in vitro* de embriones bovinos.

SITUACIÓN ACTUAL DE LA PIVE

La OPU / PIVE tiene aspectos muy positivos que contribuyen a su creciente diseminación. Una de ellas es la posibilidad de la recuperación de ovocitos de hembras embarazadas, puesto que los ovarios mantienen su actividad durante la gestación. Cuando se utiliza correctamente, la técnica no representa ningún riesgo de poner en peligro la gestación, siempre que la punción ovárica no estire excesivo el ovario, lo que ocurre aproximadamente a partir del tercer mes de gestación. Otra opción que ofrece la PIVE es el uso de hembras con limitaciones reproductivas, ya que muchas de las hembras consideradas infértiles son capaces de producir gametos viables (Dawson, 1977).

A pesar de consistir en una gran herramienta para mejorar la eficiencia reproductiva del rebaño, la PIVE pasó por muchos obstáculos para llegar al nivel que ocupa en la actualidad. Uno consistía en las grandes distancias entre las propiedades que contienen las donantes de los ovocitos y la central de las receptoras. La falta de un método que permitía el transporte de embriones a largas distancias restringía el uso de esta técnica para la pequeña escala. Pontes *et al.* (2010) propusieron el uso de incubadoras portátiles para llevar a los durante el cultivo *in vitro*. En este proyecto, los embriones fueron llevados en las incubadoras de transporte hasta 2000 km, y su transferencia resultó en una tasa de embarazo media de 39%.

Otro avance importante ha ganado recientemente que respecta a los protocolos de criopreservación. Embriones de PIV son más sensibles a los daños causados por las bajas temperaturas y tienen bajas tasas de supervivencia cuando se somete a los protocolos convencionales. Por lo tanto, la eliminación de los embriones sobrantes se consideraba una práctica común. La principal diferencia estructural de los embriones de PIV es el exceso de lípidos en el citoplasma de las células embrionarias, que se someten a modificaciones durante el enfriamiento y conducen a la muerte celular. Sin embargo, un agente lipolítico conocido como Forskolin se ha demostrado que promueve la lipólisis en células embrionarias y aumento de la criotolerancia dichas estructuras, lo que permite obtener tasas de preñez muy razonables (Men *et al.*, 2006; Sanches *et al.*, 2013).

LAS DONANTES

Variaciones fisiológicas, tales como el peso y la edad, pueden influir en la cantidad y calidad de los folículos antrales y, en consecuencia, la eficiencia de la producción de embriones de un animal. Hembras seniles o demasiado jóvenes producen ovocitos menos competentes, así como los animales que fueron sometidos a la privación de alimentos con frecuencia producen ovocitos con menos capacidad para llegar a la etapa de blastocisto (Seneda & Marinho, 2012).

Las vacas muestran una gran variación en el número de folículos antrales entre los individuos y gran repetibilidad de folículos antrales durante la vida del mismo individuo (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2011; Silva-Santos *et al.*, 2012). Esta variación individual explica por qué algunos animales son altamente eficientes en la producción de embriones tanto *in vivo* como *in vitro* y otros no tanto.

El recuento de folículos antrales (RFA) con el uso de los ultrasonidos es un parámetro ampliamente utilizado para la selección de las donantes para los programas de producción de embriones. Teniendo en cuenta ambos ovarios el RFA puede ser inferior a cinco en algunos animales y más de 50 en otros (Seneda & Marinho, 2012). Las donantes con alto RFA muestran mayor producción de embriones y mayor número de preñeces en comparación con las donantes con bajo RFA (Pontes *et al.*, 2011).

La fase reproductiva de la hembra también influye en la producción de los embriones. Hembras lactantes que no están preñadas

tienen a menudo mejores resultados por sesión de OPU / PIVE en comparación con las hembras lactantes preñadas. Considerando las hembras lactantes, las embarazadas tienen mejores resultados que las hembras no preñadas (Seneda & Marinho, 2012).

La raza de los animales también tiene un efecto sobre el número de ondas foliculares. Hembras Nelore tienen predominantemente tres ondas por ciclo (Figueiredo *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2000) y las hembras Holstein tienen dos o tres ondas por ciclo (Segerson *et al.*, 2005). Cuanto mayor es el número de ondas, mayor es la probabilidad de recuperación de folículos más pequeños. Teniendo en cuenta que la eficiencia de la recuperación de ovocitos de pequeños folículos es mayor (Seneda *et al.*, 2000), hembras Nelore se destacan en la eficiencia reproductiva.

El intervalo entre las sesiones de aspiración es un factor que debe ser tenido en cuenta por influir cuantitativa y cualitativamente la producción de ovocitos. Se sugiere que el intervalo sea, preferiblemente, de 30 días o por lo menos 15, de modo que la función ovárica no se vea afectada (Seneda & Marinho, 2012).

LAS RECEPTORAS

Un buen estado de salud y nutrición, así como el manejo adecuado de las receptoras, son esenciales para garantizar buenos resultados en la PIVE. Las tasas de preñez más altas tienden a ser obtenidas con el uso de vaquillas como receptoras. Sin embargo, las vacas frecuentemente responden mejor a protocolos de TETF que las vaquillas, que a menudo requieren la pre-sincronización hormonal (Marinho *et al.*, 2012). Recientemente, Pontes *et al.* (2009) sugirieron el uso de vacas Nelore recién paridas como receptoras de embriones. Esta es la categoría más abundante de Brasil y ha mostrado tasas de embarazo alrededor del 40%. Por lo tanto, en países como Brasil donde la mayor parte del rebaño corresponde a la raza Nelore, esto puede considerarse como una alternativa valiosa. Otras ventajas de la utilización de vacas en lugar de novillas son el calostro de mayor calidad y la menor incidencia de distocia.

Estudios recientes muestran que el ambiente uterino tiene un efecto importante en la población reserva ovárica folicular del feto, lo que influye en la producción de ovocitos de la hembra adulta. Terneras nacidas de hembras que experimentaron restricción de alimentos durante el primer trimestre de gestación pueden tener una reducción del 60% en el RFA en comparación a las hembras nacidas de madres alimentadas con una dieta adecuada (Evans *et al.*, 2010). Por lo tanto, el potencial reproductivo de una donante tiene que ser considerado desde la condición corporal de la hembra que está preñada, ya sea su madre o una receptora.

CONCLUSIONES

Una mejor comprensión de la fisiología ovárica ha permitido la manipulación de la dinámica folicular y lograr buenos índices de producción de embriones. Sin embargo, es importante tener en cuenta factores tales como la nutrición y la gestión antes de la implementación de la TE, tanto *in vivo* como *in vitro*. Las variaciones en estos factores pueden afectar tanto a los resultados de producción de embriones como la respuesta de los animales a los protocolos de TETF. Además, algunos animales muestran un buen potencial para OPU / PIVE, por presentaren naturalmente mayor cantidad de ovocitos. Otros han menor disponibilidad de los ovocitos y pueden no ser adecuados para OPU / PIVE, pero pueden ser capaces de producir números aceptables de embriones por la MOET.

REFERENCIAS

1. Bols, P.E.J.; J.L.M.R. Leroy; T. Vanholder; A. Van Soom. 2004. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology* 62(5): 906-914.
2. Burns, D.S.; F. Jimenez-Krassel; J.L.H. Ireland; P.G. Knight; J.J. Ireland. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction* 73(1): 53-62.
2. Dawson, F.L.M. 1977. Reproductive potential in female cattle discarded as infertile. *Journal of Reproduction and Fertility* 51: 53-6.
3. Evans A.C.; F. Mossa; T. Fair; P. Lonergan; S.T. Butler; A.E. Zielak-Steciwko; G.W. Smith; F. Jimenez-Krassel; J.K. Folger; J.L. Ireland; J.J. Ireland. 2010. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 67: 421-9.
4. Figueiredo, R.A.; C.M. Barros; O.L. Pinheiro; J.M.P. Sole. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (Bos indicus) cattle. *Theriogenology* 47(8): 1489-505.
5. Ireland, J.J.; G.W. Smith; D. Scheetza; F. Jimenez-Krassel; J.K. Folger; J.L.H. Ireland; F. Mossa; P. Lonergan; A.C.O. Evans. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 23: 1-14.
6. Marinho, L.L.; R.M. Untura; F. Morotti; L.L. Moino; A.G. Rigo; B.V. Sanches; J.H.F. Pontes; M.M. Seneda. 2012. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. *Animal Reproduction* 9(3): 323-28.
7. Men, H.; Y. Agca; L.K. Riley; J.K. Critser. 2006. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* 66(8): 2008-16.
8. Nandi, S; V.G. Kumar; M.S. Chauhan. 2006. In Vitro production of bovine embryos: we need to stop or proceed - a review. *Agricultural Review* 27(2): 122-9.
9. Nandi, S; V.G. Kumar; M.S. Chauhan. 2006. In Vitro production of bovine embryos: we need to stop or proceed - a review. *Agricultural Review* 27(2): 122-9.
10. Pontes J.H.F.; I. Nonato-Junior; B.V. Sanches; J.C. Ereno-Junior; S. Uvo; T.R.R. Barreiros; J.A. Oliveira; J.F. Hasler; M.M. Seneda. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. *Theriogenology* 71: 690-7.
11. Pontes J.H.F.; F.A.M. Sterza; A.C. Basso; C.R. Ferreira; B.V. Sanches; K.C.P. Rubin; M.M. Seneda. 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (Bos indicus) donors. *Theriogenology* 75: 1640-6.
12. Pontes, J.H.F., K.C.F. Silva; A.C. Basso; A.G. Rigo; C.R. Ferreira; G.M.G. Santos; B.V. Sanches; J.P.F. Porcionato; P.H.S. Vieira; F.S. Faifer; F.A.M. Sterza; J.L. Schenk; M.M. Seneda. 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bos taurus, Bos indicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74: 1349-55.
12. Rumpf, R. 2007. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36(supl.): 229-33.
13. Sanches, B.V.; L.S.R. Marinho; B.D.O. Filho; J.H. Pontes; A.C. Basso; M.L. Meirinhos; K.C. Silva-Santos; C.R. Ferreira; M.M. Seneda. 2013. Cryosurvival and pregnancy rates following exposure of IVF-derived Bos indicus embryos to forskolin prior to vitrification. *Theriogenology in press*.
14. Segerson, E.C.; T.R. Hansen; D.W. Libby; R.D. Randel; W.R. Getz. 2005. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *Journal of Animal Science* 59: 1026-46.
15. Seneda M.M.; C.R. Esper; E.R. Andrade; J.M. Garcia; J.A. Oliveira. 2002. Shorter interval between fsh administration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery. *Theriogenology* 57: 684 (Abstract).
16. Seneda, M.M.; C.R. Esper; J.M. Garcia; R. Vantini. 2000. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained in vitro. Abstracts of 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden 1: 62 (Abstract).
17. Seneda, M.M.; L.S.R. Marinho. 2012. Fatores que interferem na população folicular e produção de oócitos em bovinos. *Boletim informativo SBTE* 2012.
18. Silva-Santos, K.C.; G.M.G. Santos; L.S. Siloto; F. Morotti; T.N. Marcantonio; M.M. Seneda. 2012. Comparação entre a população folicular ovariana antral e pré-antral de fêmeas Nelore (Bos indicus) e 1/2 Nelore x Angus (1/2 Bos indicus x Bos taurus). *Acta Scientiae Veterinariae* 40: 345 (Abstract).
19. Viana, J.H.M.; A.M. Ferreira; W.F. Sá; L.S.A. Camargo. 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 2501-9.
20. Viana, J.H.M.; L.G.B. Siqueira; M.P. Palhao; L.S.A. Camargo. 2012. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Animal Reproduction* 9(1): 12-8.