

## GENERACIÓN DE GEMELOS HOMOCIGÓTICOS POR BIPARTICIÓN EMBRIONARIA EN BOVINOS DE CARNE.

Generation of homozygous twins embryo bipartition in beef cattle.

Jenin V. Cortez<sup>2</sup>, Nilton L. Murga<sup>1,2</sup>, Ilse S. Cayo<sup>1,2</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.35>

<sup>1</sup> *Universidad Nacional Toribio  
Rodríguez de Mendoza – UNTRM,  
Amazonas, Perú*

<sup>2</sup> *Instituto de Investigación en Ganadería  
y Biotecnología (IGBI), Amazonas,  
Perú*

*E-mail: jenin.cortez@untrm.edu.pe*

### RESUMEN

En animales, la bipartición embrionaria ocurre de manera espontánea en menos del 1% de los casos. Este suceso, es posible realizarlo mecánicamente en estadios tempranos de desarrollo embrionario, con el uso de micromanipuladores. El presente reporte de caso tuvo como objetivo determinar el estadio embrionario óptimo para la bipartición de embriones (sin el uso de micromanipuladores). Para este trabajo, se utilizaron embriones bovinos producidos in vivo por la técnica de superovulación (SOV). Los embriones utilizados fueron en estadio de mórula y blastocisto de calidad I (excelente), los cuáles fueron divididos manualmente con microcuchilla en medio de manipulación. Luego de la división, los embriones fueron transferidos a un medio de cultivo por 2 horas, para ser luego transferidos a vacas receptoras previamente sincronizadas. La confirmación de la preñez se realizó a los 35 días luego de la transferencia. La producción artificial de gemelos homocigóticos puede realizarse aún en condiciones de campo a partir de embriones en estadio de mórula.

**Palabras clave:** *Homocigóticos, bipartición, superovulación, microcuchilla, embrioblasto.*

### ABSTRACT

In animals, embryo bipartition occurs spontaneously in less than 1% of cases. This outcome is possible can be performed mechanically in early stages of embryonic

development with the use of micromanipulators. This case report aimed; to determine optimal for bipartition embryonic stage embryo (without the use of micromanipulators). For this work, bovine embryos produced in vivo by the technique of superovulation

(SOV) we were used. Were used morula and blastocyst state of excellent quality, which were divided among handling manually with microblade. After the bipartition, the embryos were transferred to a culture medium for 2 hours to be then transferred to recipient cows previously synchronized. The confirmation of pregnancy was performed at 35 days after the transfer. The artificial production of homozygous twins can still be performed under field conditions from embryos in morula stage.

**Keywords:** *homozygous, bipartition, superovulation, microblade, embryoblast*

## INTRODUCCION.

Durante la última década, la investigación y aplicación de nuevas tecnologías relacionadas con la reproducción animal ha evolucionado de manera acelerada con el desarrollo de técnicas que incrementan la capacidad reproductiva y permitan el mejoramiento genético (Romo, 1994). Entre las biotecnologías reproductivas, que mayor atención han recibido están la superovulación, transferencia embrionaria, criopreservación de gametos y embriones, cultivo in vitro de embriones, así como la micromanipulación embrionaria (bipartición embrionaria) con fines investigativos, o de mejora genética. La bipartición de embriones de mamíferos y el aislamiento de blastómeros es una técnica muy útil para generar gemelos o múltiplos. Se han visto gemelos idénticos de varias especies a lo largo de la historia y el avanzado en las últimas décadas a una variedad de aplicaciones en la medicina veterinaria y humana es muy importante (Illmensee et al., 2005).

La micromanipulación en mamíferos con fines de producir gemelos idénticos se realiza en estadios tempranos del embrión (Navarro, 2003). Al presente, existen variaciones en la micromanipulación embrionaria empleadas en animales de granja y/o de laboratorio, para producir gemelos genéticamente idénticos (Merchant et al., 1997), siendo la más importante, la partición embrionaria por microcirugía y la separación y cultivo de blastómeros aislados por métodos enzimáticos y mecánicos (Agca et al., 1988; Rexroad, 1997). Sin embargo, a pesar de que las técnicas se vienen desarrollándose desde décadas atrás, aún no se cuenta con resultados óptimos, ni con información que pueda ser replicado sin un equipamiento sofisticado. El presente trabajo aporta información sobre la técnica de bipartición embrionaria desarrollada en estadios de mórula y blastocisto, aplicable en condiciones de campo con equipamiento básico. Lo que sugiere la posibilidad de

usarlo como herramienta para lograr múltiples beneficios tales como la obtención de material biológico, incremento del porcentaje de preñez, el progreso genético, entre otros.

## PRESENTACION DEL CASO

En el trabajo, buscamos la posibilidad de aplicar la técnica de bipartición embrionaria para la producción de gemelos homocigóticos a partir de embriones en estadio de mórula y blastocisto. Para ello, se recuperaron embriones bovinos de una vaca de raza Aberdeen Angus (rojo) de 2 años de edad, por la técnica lavado de donadoras superovuladas con 200mg de FSH (Folltropin V, Bioniche) y 200 UI de eCG (Folligon, Intervet) al día 6.5 a 7 después de la primera inseminación artificial, técnica descrita por Chesta (2010).

El número de embriones viables recuperados fue de 8, seleccionándose una mórula y blastocisto ambas de condición excelente (la clasificación fue realizada acorde a la clasificación propuesta por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones) (IETS, 2010). Los embriones fueron transferidos a una placa de 60 mm de diámetro, conteniendo microgotas de 20ul con medio de micromanipulación compuesta por TCM-Hepes suplementado con 30% de suero fetal bovino (SFB), donde ambos fueron bipartidos con ayuda de una ultra Sharp splitting blades (Bioniche, USA).

La bipartición fue realizada considerando mitades exactas del macizo celular de la mórula y el embrioblasto para el caso del blastocisto. Las mitades fueron transferidos al medio SOF (Vajta, 2003), suplementado con 0.4 mM piruvato de sodio, 0.2 mM de L- glutamina, 1X de aminoácidos esenciales y no esenciales, 10 ng/mL de EGF, 2% de SFB, 0.1 mg/mL de ácido cítrico, 0.5 mg/mL de myo-Inositol y 0.3% de albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos, los reactivos usados de la marca Sigma Aldrich, USA. Posteriormente, las mitades de la mórula fueron transferidos a una pajillas de 0.25 cc para poder ser transferidos a dos vacas receptoras Aberdeen Angus de dos años de edad, previamente sincronizada (descrito por Chesta, 2010). La confirmación de la preñez se realizó a los 35 días post transferencia con ecografía transrectal con un equipo de ultrasonido (Esaote, Italia).

La vaca que recibió a las dos mitades del embrión en estadio de mórula dio positivo a diagnóstico temprano y parió un par de gemelos homocigóticos 275 días después (duración de gestación, 282 días). Este logro obtenido, demuestra la posibilidad de poder aplicar la

técnica de bipartición embrionaria bajo condiciones de campo con equipamiento básico (estereoscopio y microcuchilla), ya que al no requerir incubación simplifica el proceso. Nuestro equipo sugiere la bipartición embrionaria en estadio de mórula, porque presenta varias ventajas por tener un macizo de blastómeros mucho más visible y grande, facilita la bipartición manual y la rápida recuperación de las dos mitades embrionarias sin zona pelúcida.



Figura 1. Gemelos Homocigóticos de la Raza Aberdeen Angus, producidos por Bipartición Embrionaria.

## DISCUSION

En la década de los 70 se pensaba que los embriones en fases tempranas de la segmentación podrían no sobrevivir después de una microcirugía (Willadsen et al., 1984.). Fue recién en los años ochenta cuando se demostró que las mórulas y blastocistos de los animales domésticos eran capaces de desarrollarse después de una partición y producir nacimientos viables (Rorie et al., 1987). Actualmente la bipartición de embriones permite la producción de gemelos idénticos al dividir el embrión original por métodos microcirugía, con ayuda de un micromanipulador. Sin embargo, en nuestro trabajo hacemos uso de bisección manual con microcuchilla lo que sugiere su aplicabilidad con equipamiento mínimo bajo condiciones de campo. Las tasas de producción de gemelos homocigóticos van desde poco más de 30% en bovinos y ovinos (Edwards et al., 1998; Heyman et al., 1998; Williams et al., 1984), a porcentajes de gestación superiores a 60% (Rorie et al., 1987) e incluso, en algunos casos, equivalentes a 100% (Williams et al., 1983). En nuestro caso, el trabajo se transfirió 4 hemi-embriones, obteniéndose una tasa de preñez de los hemi-embriones del 50% para el caso de

mórula, similar a los reportados por otros investigadores.

## CONCLUSION

En conclusión la producción artificial de gemelos homocigóticos puede realizarse con equipamiento mínimo bajo condiciones de campo a partir de embriones en estadio de mórula, este trabajo generamos gemelos idénticos que puede ser replicado considerando las múltiples ventajas, incremento de la tasa reproductiva de la donadora, evitar los casos de freemartinismo y futura aplicación de una parte de las blastómeros para las pruebas de genómica.

## REFERENCIAS

- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Peschel DE, Schaefer DM, Rutledge JJ. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology*, 1998; 50: 129-145.
- Chesta P. Sincronization of ovulation, fertilization rates and embryo quality in bovine embryo donors. M.Sc. Thesis, National University of Cordoba, Argentina; 2010. (Published in Spanish).
- Edwards RG, Beard HK. How identical would cloned children be? An understanding essential to the ethical debate. *Hum. Reprod. Update*, 1998; 4:791-811.
- Heyman Y, Vignon X, Chesné P, Le-Bourhis D, Marchal J, Renard JP. Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* 1998; 38:595-603,
- Illmensee K, Kaskar K, Zavos P. 2005. Efficient blastomere biopsy for mouse embryo splitting for future applications in human assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005; 11(6): 716-725.
- Merchant H. Clonación en mamíferos: bases biológicas e implicaciones teóricas, prácticas y éticas. *Ciencia*, 1997; 48:49-57.
- Navarro MC. Técnicas de Clonación de embriones, *Ciencias Veterinarias*. 40pp. Accesado en línea <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c2.pdf>
- Rexroad CE, Powell AM. Culture of blastomeres from in vitro- matured, fertilized, and cultured bovine embryos. *Molec. Reprod. Dev.* 1997; 48:238- 245.
- Romo S. Biotecnología reproductiva: avances en ganado bovino. *Boletín Técnico Internacional. Schering-Plough División Veterinaria*, 1994; 1-8.

- Rorie RW, Godke RA. Bisection of bovine embryos. In: Embryotechnologies to domestic animals T. Greve, editor. Codenhagen. 1987; 1-9.
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. Biol Reprod. 2003; 68:571-8.
- Willadsen SM, Godke RA. A simple procedure for the production of identical sheep twins. Vet. Rec. 1984; 114: 240-243.
- Williams TJ, Elsdon RP, Seidel GE. Bisecting bovine embryos: methods, applications and success rates. Proceedings of the Animal Conference on Artificial Insemination and Embryo Transfer in Beef Cattle. Denver, CO, USA, 1983, pp. 45-51.
- Williams, TJ, Elsdon, RP, Seidel, GE. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. Theriogenology, 1984; 22: 521-531.