

# Transferencia embrionaria:

## realidad, presente y futuro

Miguel Alcaide Guindo

Veterinario del Departamento de MOET TAUSTE GANADERA, S. A.

La Transferencia de Embriones es una técnica que en un principio tenía como objetivo tan sólo el incrementar cuantiosamente el número de descendientes de aquellas hembras de un alto valor genético.

Habitualmente los programas de selección genética se han basado en la utilización de semen de sementales catalogados como mejoradores. Como complemento a estos sistemas de selección se desarrolló la técnica de transferencia embrionaria con el fin de intentar conseguir el desarrollar estos programas de selección teniendo en cuenta ya no sólo la influencia de la mejora ejercida por los machos sino la de tanto estos machos como la ejercida por las hembras.

Hoy en día las técnicas de Transferencia Embrionarias se encuentran en pleno desarrollo y como veremos más adelante se complementan con otras técnicas laboratoriales tales como la embriocentésis, clonación, sexaje y congelación para intentar incluso conseguir que la incidencia de aquellas hembras de élite en su raza sea comparable a la incidencia que pueden ejercer los sementales de élite.

Actualmente son muchos los proyectos de investigación que se basan en técnicas de Transferencia Embrionaria en todo el mundo, pero como es de suponer existen una serie de países entre los cuales se encuentra el nuestro, en los que estas técnicas están aún en la fase de desarrollo y tienen como objetivo la consecución de un incremento en el número de descendientes de las hembras de alto valor genético.



Congelación de embriones.

### Realidad y presente de la tecnología MOET

El uso comercial de la tecnología de Transferencia Embrionaria comenzó con la primera empresa del sector fundada en 1971 en Alberta (USA). Hoy en día dicha tecnología se encuentra difundida por la mayor parte de los países industrializados.

Esta técnica reproductiva se desarrolla asiduamente en ganado bovino lechero, existiendo un número importante de empresas extranjeras dedicadas a dicho tema. En cuanto a su aplicación en otras especies cabe destacar la especie hu-

mana y en menor cuantía los pequeños rumiantes y algunas especies en peligro de extinción. En cuanto a las especies de laboratorio se trabaja preferentemente en ratones, ratas y en conejas.

Hoy en día la tecnología de Transferencia Embrionaria no sólo se encamina a la recolección de embriones de un buen ejemplar y su transferencia no quirúrgica y en fresco a otros animales, sino que a su vez, se basa en la posibilidad de congelar dichos embriones y poder conservarles a  $-196^{\circ}$  C durante un período de tiempo ilimitado hasta su transferencia en el momento deseado.

La técnica de ET aunque para algunos siga pareciendo una técnica semidesarrollada es una técnica que en la actualidad se emplea con buenos resultados. Esta tecnología de reproducción cada día se desarrolla a un nivel más práctico, disponiendo en la actualidad el pequeño ganadero de la posibilidad de realizarla sin demasiado esfuerzo en su propio establo.

Esta tecnología se aplica para diferentes programas. Como ejemplo podemos nombrar los programas de selección de sementales que se llevan a cabo en países como Canadá, este país actualmente emplea esta tecnología para proceder a una valoración más rápida y efectiva en la selección de sementales bovinos lecheros, este programa se conoce con el nombre de "TEAM".

La realidad actual de la técnica de MOET se puede observar ojeando los datos publicados por Thibier (1988), en ellos se observa que anualmente se transfieren unos 200.000 embriones bovinos en todo el mundo. Algo más de la mitad de ellos lo son en Norte América. En Europa se transfirieron en 1986 unos 35.000, existiendo una gran progresión en países como Francia, Alemania y Países Bajos. De cualquier forma si se comparan estas cifras con las de 80 millones de inseminaciones actuales se concluye que todavía la técnica de MOET debe desarrollarse.

En nuestro país no existen datos exactos acerca del uso de las técnicas de ET que nos den una aproximación del número de embriones transferidos. Como orientación diré que en una sola empresa privada del sector (Tauste Ganadera, S. A.) se viene trabajando sistemáticamente en esta técnica tanto en fresco como en congelado. Durante el año 1988 se realizaron 47 lavados y se recolectaron 336 embriones, 159 de los cuales se transfirieron en fresco o en congelado y 129 se depositaron en el banco de embriones de la propia empresa. En 1989 los números se han incrementado sustancialmente, existiendo en la actualidad un banco de embriones congelados para la venta y un Servicio de Transferencia Embrionaria

por parte de esta empresa a las ganaderías que lo soliciten.

Los porcentajes de gestaciones positivas que se obtienen en esta empresa son de 55% en fresco y del 45% en congelado, lo que se aproxima enormemente a los resultados publicados por los autores extranjeros.

En la actualidad se están poniendo en marcha diferentes programas de Mejora genética del ganado bovino por parte de diferentes Comunidades Autónomas (Madrid, Cantabria, Galicia, etc.), lo que probablemente se traducirá en una pronta e importante mejora de la cabaña bovina lechera Española.

De todo lo expuesto se puede deducir que la tecnología de la Transferencia embrionaria se encuentra lo suficientemente avanzada como para poder ser empleada con éxito en la ganadería Española.



### Futuro de la tecnología MOET

Las investigaciones que hoy en día se llevan a cabo se basan en conseguir mejorar la eficacia de esta técnica en el sentido de poder obtener un mayor número de descendientes de aquellas hembras catalogadas como de élite, para que de esta manera se pueda ejercer una mayor incidencia en la mejora de las diferentes razas.

Actualmente se llevan a cabo investigaciones encaminadas a conseguir otros métodos alternativos de superovulación artificial de las hembras así como la clonación de embriones.

Por otra parte, se observa un marcado interés en conseguir un sistema de sexaje de los embriones que permita la obtención de tan solo animales del sexo deseado.

Como complemento existen una serie de investigaciones menos avanzadas entre las que podemos nombrar las encaminadas a realizar transferencia de material genético para obtener animales con unas cualidades determinadas, esto es la tecnología conocida con el nombre de

Transgénicos, o las de maduración in vitro de ovocitos y posterior fecundación y maduración in vitro.

Según lo expuesto cuatro son a mi entender los parámetros que se vislumbran como futuro de la tecnología MOET:

- A) Estudio de las alternativas de superovulación.
- B) Clonación de embriones.
- C) Sexaje de embriones.
- D) Congelación de embriones.

### Otras alternativas de control de la superovulación

En las primeras investigaciones se compararon los resultados obtenidos mediante las técnicas de superovulación bien con PMSG o con FSH. Se observó que el número de embriones viables era mayor cuando se utilizaban técnicas de superovulación mediante FSH (Elsden et al 1978). Se hicieron investigaciones acerca de la mejora de resultados al combinar las dos hormonas (Seidel et al 1971).

Murphy et al (1984) observaron que cuando se utilizaba FSH con una pequeña cantidad de LH se obtenían peores resultados de superovulación que al utilizar FSH pura. Donalson y Ward (1985) eliminaron la fracción LH del compuesto FSH hasta entonces utilizado, consiguiendo unos resultados de casi el doble de respuesta en la superovulación.

Saumande y Chupin (1986) utilizando anti-PMSH a donadoras que habían sido previamente tratadas con PMSG observaron que cuanto mayor era la dosis de PMSG menor era la respuesta de superovulación. Moyaert et al (1985) observaron que inyectando un anticuerpo monoclonal de la PMSG en el momento del estro y consiguiente tratamiento de 3.000 UI de PMSH el día 10 con prostaglandina el día 12 se producía un rápido descenso de los niveles de estradiol y por consiguiente un menor número de folículos que no llegaban a ovular.

La utilización del GnRH ha sido estudiada en varias ocasiones y se han observado diferentes resultados

según autores. Wubishet et al (1986) inyectaban un total de 50 mg de FSH durante un período de cinco días con la inyección de 250 mg de GnRH, observaron que esta práctica disminuye el número de no fertilizados por recolección desde 2,3 a tan sólo 0,8, incrementando por el contrario el número de embriones fertilizados por recolección desde 6,5 a 9,3.

De cualquier forma siempre se han publicado datos que resaltan la tremenda variabilidad individual y especialmente entre el período que transcurre desde la inyección de prostaglandinas y la presentación del pico de LH. Parece claro que es necesario el investigar sobre otro método de asegurar la presencia de este pico de LH asegurando de esta forma la ovulación de todos los folículos en condiciones de producir un ovocito viable.

Varias son las hormonas en las que habría que fijar las investigaciones futuras:

**1-Inhibina:** Los folículos bovinos contienen Inhibina, la cual provoca un feedback negativo en la liberación de FSH. Si se preparasen anticuerpos de la Inhibina o inmunizando a los animales contra esta hormona se esperaría un incremento en la liberación natural de FSH.

**2-FGI:** El Factor inhibidor Folicular ha sido detectado en los folículos. Este factor es probablemente el que juega un importante papel en la inhibición del crecimiento de otros folículos al menos en ovinos. Un estudio profundo de este factor podría ayudar a la consecución de un mayor porcentaje de desarrollo folicular.

**3-SHI:** La Hormona Esteriode de Inmunización puede ser otra de las que juegue un importante papel en la regulación de la superovulación ya que, unas altas concentraciones de andrógenos pueden "inhibir la ovulación. Bindon et al (1986) observaron que la inmunización de ovejas contra la androsterona incrementa el número de ovulaciones.

Todavía no ha sido demostrado que ninguno de estos factores provoquen algún efecto positivo en la superovulación de bóvidos, pero

una investigación más profunda es necesaria, ya que se sabe que alguno de estos factores incrementa el tamaño de la camada en otras especies de menor talla.

Bindon et al (1986) observaron que el ganado bovino parece ser más sensible a los tratamientos de superovulación mediante FSH que con ningún otro tratamiento, sin embargo se sabe poco a cerca de las diferencias genéticas y su relación con la respuesta a la superovulación de vacas. Por otra parte se han visto diferencias genéticas en otras especies como la ovina, donde se ha estudiado este factor en la raza Merina (McNatty et al 1985, Bindon et al 1986) y en la raza Javanese (Brandford et al 1986).

**Clonaje de embriones**

Tras muchos años de duro trabajo los científicos e investigadores han sido capaces de mejorar las técnicas de embriocentesis (dividir un embrión en dos mitades) con el fin de conseguir animales genéticamente

te idénticos. De cualquier forma, estas técnicas tan sólo permiten la obtención de un número finito de animales procedentes de un mismo embrión.

Como consecuencia de las investigaciones realizadas para poder obtener un número elevado de animales genéticamente idénticos se pusieron en prácticas trabajos de clonaje de embriones para de esta manera poder obtener un número infinito de animales genéticamente idénticos. Así pues, con el uso de técnicas de transferencia nuclear por parte del Dr. Willadsen se consiguió por primera vez en el mundo clonar embriones de oveja con éxito y algo más tarde el clonaje de embriones de vacas lecheras.

El Dr. Willadsen consiguió el primer nacimiento de ternera procedente de técnicas de clonaje en 1986 en los Estados Unidos. De este mismo clonaje se conservan actualmente seis generaciones diferentes de embriones procedentes del mismo embrión.

(Doc. Agrar. División Ganadera).

Recogida de embriones de vaca donante «campeona».



Transplante de un embrión FLECKVIEH en una novilla receptora de otra raza.



Desde el comienzo de las prácticas de clonaje se han conseguido más de 100 animales nacidos mediante estas técnicas.

El diagrama que aparece en este trabajo explica esquemáticamente los pasos que se siguen para la realización de estas técnicas de clonaje.

La técnica comienza con la recolección de un embrión en estadio de 16 células. Mediante técnicas de transferencia nuclear se extrae uno de los 16 blastómeros, el cual contiene la información genética completa del animal. El núcleo se transfiere posteriormente al citoplasma de un ovocito no fertilizado o dentro de un óvulo u ovocito vacío, al cual se le había eliminado su núcleo. Este clon se cultiva *in vitro* durante un día en un tubo de ensayo y luego se transfiere al útero de una oveja, donde se mantiene durante el período de cuatro-cinco días (normalmente se introducen un total de 15-30 embriones clonados en la misma oveja). Se recolectan los embriones posteriormente mediante lavado del útero y normalmente nos encontramos con embriones en estadio de 16 células a blastocisto. Estos pueden ser transferidos a otras novillas receptoras o pueden destinarse a posterior clonaje para producir una segunda generación y posteriormente tercera, cuarta e infinitas generaciones de embriones clonados.

Partiendo desde el embrión original de 16 células se pueden obtener teóricamente 16 embriones, todos del mismo sexo y genéticamente idénticos. El proceso de clonaje puede realizarse una y otra vez con lo que se podría obtener un número ilimitado de animales procedentes de la misma vaca.

Actualmente las técnicas de clonaje permiten obtener tres generaciones de embriones clonados en menos de un mes. Esta tecnología es ciertamente un gran avance genético y puede permitir la obtención rápida de una gran influencia genética de una vaca sobre su raza.

Aún existen ciertos problemas para que estas técnicas de clonaje se realicen asiduamente. Así, por ejemplo, el porcentaje de gestaciones que

se obtienen con estos embriones clonados en los Estados Unidos es del 40% lo que significa unos porcentajes de gestación un 15% menores que los registrados cuando se transfieren embriones originales. El porcentaje de embriones que se abortan es también mayor. Los embriones clonados pueden ser también congelados pero hoy en día todavía no se han publicado porcentajes de gestaciones positivas obtenidas.

Queda claro que aún es necesario poner a punto la técnica ya que todavía existen muchas cuestiones biológicas como pueden ser las de: ¿Bajo que parámetros se deben elegir las células madre para obtener mejores resultados?, ¿en qué estado deben encontrarse? o ¿qué tipo de óvulo debe utilizarse?

El costo económico de la técnica de clonaje es actualmente alto y más todavía en el caso de que no se traduzca en resultados positivos. Probablemente con el trascurso del tiempo este coste se verá reducido notablemente. De cualquier forma la técnica de clonaje es económicamente viable en la actualidad tan sólo para las vacas de super élite no siendo así para un tipo de vaca comercial.

Actualmente se encuentran opiniones de tipo muy diverso acerca de la efectividad y conveniencia de profundizar en la técnica del clonaje. Como opinión personal mencionaré que siempre que se instaura una nueva técnica de reproducción se forman dos bandos opuestos y que por ello siempre hay ganadores y vencidos. Como ejemplo basta con nombrar lo ocurrido cuando se empezó a trabajar tanto con la IA o con la ET (hoy en día más comúnmente llamada MOET, lo que se refiere a las iniciales inglesas de Multiovlación Embryo Transfer).

El clonaje se aventura como una técnica de reproducción del futuro, ya que esta técnica tiene un enorme potencial de producción de un número elevado de descendientes una y otra vez. Cuando el coste y la efectividad de esta técnica mejoran se convertirá en una técnica a utilizar por los criadores de ganado.

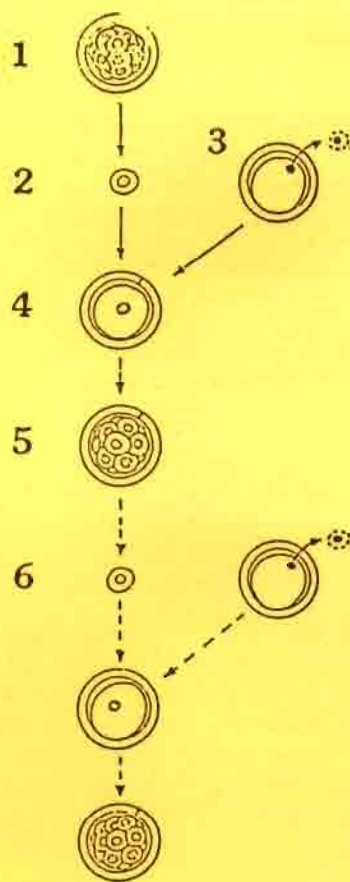
En cualquier momento se plantea llegando a este punto el tema de la posibilidad de manipular genéticamente los embriones humanos con el fin de obtener un tipo de personas genéticamente idénticas.

A todos se nos viene a la mente la famosa obra «Un Mundo Feliz» en el que el nacimiento de los seres humanos se encontraba perfectamente programado, no sólo a nivel temporal sino a nivel genético con el fin de obtener seres aptos para ciertas misiones.

Con la técnica del clonaje hoy en día es teóricamente posible obtener un número infinito de personas genéticamente idénticas, lo que en parte puede representar un cierto desafío para la humanidad.

Dejando aparte la ciencia ficción debemos mencionar el gran avance que esta técnica puede suponer en el avance genético de nuestras vacas lecheras. Todo el mundo sabe que mientras hay vacas que difícilmente llegan a producir 5.000 litros de leche por año existen otras que producen más de 15.000. Estas vacas, utilizando técnicas reproductivas habituales, suelen dejar tan sólo una descendencia compuesta por 3-4 hijas, lo que no ejerce prácticamente ningún peso en la mejora de la raza. Con la técnica de clonaje estos animales pueden multiplicar una y otra vez esta descendencia, pero además dando un tipo de hijas exactamente idénticas y si se apoya esta técnica con la de la congelación embrionaria se puede obtener hijas de esta vaca una vez que ya se ha comprobado el rendimiento de su hermana genéticamente idéntica.

El sexaje de embriones dejará de ser un problema cuando se utilicen estas técnicas, con lo cual los ganaderos que lo deseen tan sólo obtendrán partos que den como resultados hembras de un alto valor genético, eliminándose de esta manera las pérdidas que ocasiona la obtención de machos en las ganaderías de vacas lecheras. El caso contrario puede darse como ejemplo en ganado vacuno de lidia, en el que se podrán obtener machos genéticamente idénticos a algún macho que haya demostrado su bravura en la plaza.



**1:** Una mórula en estadio de 16 células.  
**2:** Un blastómero que ha sido extraído de la mórula mediante técnicas de transferencia nuclear.  
**3:** Un ovocito o huevo no fertilizado al que se le elimina el contenido o núcleo y se le transfiere el blastómero extraído.  
**4:** Cultivo in vitro del huevo en tubo de ensayo y posteriormente incubado en el útero de una oveja durante 7 días, lo que se traduce en la obtención de un embrión en estadio de 16 células.  
**5:** Mórula en estadio de 16 células. Esta puede volver a utilizarse para la obtención de una segunda generación.  
**6:** Blastómero de segunda generación que se ha extraído de su mórula correspondiente y que puede transferirse a otro huevo vacío para su posterior cultivo.

### Sexaje de embriones

El sexaje de embriones se encuentra actualmente en un estado en el que todavía no se ha conseguido obtener una metodología lo suficientemente eficaz y económica como para emplearla asiduamente en las prácticas diarias.

Hoy en día es posible realizar el sexaje de embriones recurriendo al estudio del cariotipo de los mismos por técnicas de tinción del material celular. También es posible sexar los embriones atendiendo a tecnologías inmunitarias, entre las que aparecen como más viables las de detección del antígeno HY.

La técnica de sexaje conocida con el nombre de sonda de DNA está siendo puesta a punto en el INRA. Esta técnica parece ser prometedora y de pronta aplicación.

A mi entender con el desarrollo de la tecnología de clonación y en conjunción con la tecnología de tinción

y estudio del cariotipo se pondrá en un futuro no muy lejano de la posibilidad del sexaje de embriones a un coste relativamente bajo, lo que se traducirá en la utilización de la tecnología de ET a un nivel extremadamente renatable.

### Congelación de embriones

La técnica de congelación embrionaria podemos decir que se encuentra muy desarrollada en la especie bovina. Como muestra basta decir que en la actualidad se practica la congelación de embriones bovinos de 7 días de edad y se conservan en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  durante períodos indefinidos de tiempo.

Todas las empresas comerciales del sector utilizan técnicas de congelación clásicas utilizando los biocongeladores automáticos y congelando los embriones a una velocidad lenta en una solución de PBS al 8-10% de glicerol.

En nuestra empresa empleamos esta técnica clásica con buenos resultados, lo que demuestra la posibilidad de utilizar esta técnica en países desarrollados y que verdaderamente estén interesados en realizar una mejora genética de su cabaña de animales lecheros.

Esta tecnología de crioconservación de embriones sigue desarrollándose día a día, ya que en la actualidad el coste que genera es lo suficientemente elevado como para que se investiguen sistemas de congelación alternativos más baratos. Este elevado coste viene determinado en gran medida por la necesidad de utilizar biocongeladores automáticos que además de consumir una cantidad apreciable de nitrógeno líquido requieren de una inversión considerable de dinero para su adquisición.

Actualmente se sigue investigando en técnicas de congelación que permitan la conservación de los embriones a esa temperatura pero sin la necesidad de utilizar los biocongeladores automáticos. Como ejemplo podemos nombrar la técnica de vitrificación, la cual aparece como una técnica laboriosa pero que permite la conservación de los embriones a  $-196^{\circ}\text{C}$  sin haber sido congelados.

### Conclusiones

Las técnicas de Transferencia embrionaria se encuentran actualmente a un nivel que permiten la comercialización de embriones congelados de alto valor genético a un coste al alcance de los ganaderos de vacuno lechero.

En los próximos años asistiremos probablemente a un desarrollo fulminante de las técnicas asociadas a la técnica de Transferencia Embrionaria, lo que permitirá mejorar la genética de los efectivos de vacas lecheras a unos niveles insospechados.

El desarrollo de técnicas asociadas tales como la clonación y el sexaje de embriones impulsarán enormemente la utilización de esta tecnología reproductiva.