

Fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario en bovinos



Fotografía: Ganadería El Tesoro

Marcello Rubessa¹ and Matthew B. Wheeler^{1,2} ¹Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, ²Department of Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, U.S.A.

El uso de tecnologías de reproducción asistida (TRAs) en el ganado tiene como objetivo aumentar y mejorar el número de animales nacidos. Con respecto a la aplicación de la fertilización *in vitro* de ganado hay dos áreas principales a considerar: el laboratorio o la producción de embriones (*maduración, fertilización, cultivo, crioconservación, clonación y manipulación*) y el campo o el lado animal (*sincronización, aspiración de ovocitos, transferencia de embriones, diagnóstico de la preñez y salud animal*).

En este trabajo, examinaremos el primer aspecto, la producción de

embriones in vitro, pero nuestro objetivo será demostrar cómo la producción de embriones *in vitro* en el ganado puede aprovechar varias áreas científicas emergentes diferentes de la tecnología de ingeniería genética.

Las dos preguntas generales a tener en cuenta al evaluar protocolos para la producción de embriones *in vitro* son: 1) ¿el protocolo maximiza la producción de embriones? y 2) ¿es la calidad del embrión producido lo suficientemente elevada como para producir una preñez?

Casi cada semana hay un nuevo artículo publicado en la literatura

que describe cómo una proteína conocida, desconocida, un factor de crecimiento, una molécula pequeña u otro compuesto puede afectar la tasa de producción de blastocitos bovinos *in vitro* de manera positiva o negativa. Un problema principal es que casi todos estos procedimientos se desarrollan para su uso en una placa de Petri. Tales protocolos típicamente se hacen en gotas de medios, que son sistemas estáticos en lugar de sistemas dinámicos o de flujo que son más similares a lo que ocurre naturalmente en las trompas de Falopio y el útero. Una posible solución a este

problema es intentar imitar la situación natural tanto como sea posible usando sistemas microfluídicos en microcanales.

Los sistemas de microcanales para embriones de mamíferos se desarrollaron mediante la combinación de tres áreas de investigación distintas: 1) física (*hidrodinámica*), 2) ingeniería eléctrica (*microfabricación*) y 3) biotecnología de la reproducción (*producción y manipulación de embriones in vitro*).

Otro tema importante en la producción de embriones *in vitro* es la capacidad de identificar aquellos embriones que tienen el mayor potencial de desarrollo. La evaluación morfológica es actualmente el método principal utilizado para determinar la viabilidad del embrión durante los ciclos de FIV. Esta evaluación incluye la observación del patrón de desarrollo de embriones durante el cultivo, incluyendo el momento y la tasa de clivaje, así como el color celular, la forma, la densidad, la transparencia, la textura, el número y la fragmentación.

En esta revisión, nuestro objetivo es describir algunos de los avances obtenidos por las biotecnologías de la reproducción aprovechando algunas de las nuevas tecnologías desarrolladas por diferentes áreas de la ingeniería.

Microfluídica fecundación *in vitro*

El tracto reproductor femenino tiene una serie de funciones, incluyendo la facilitación de la migración de espermatozoides al sitio de fertilización (*en la unión ampular-ístmica en el oviducto*), donde los ovocitos están esperando. Otra función importante del tracto femenino es la selección de espermatozoides sanos y móviles para la fertilización.

Si consideramos la preparación de los gametos el primer paso de la producción de embriones (*PIV in vitro*) robusta, podemos definir a la *fertilización in vitro* (FIV) como paso número dos. En general, cuando hablamos de FIV, nos referimos a la co-incubación de los gametos. La relación entre el número

de ovocitos y gametos cambia según los protocolos, pero es típicamente 1 ovocito a ~ 10.000 espermatozoides. Lamentablemente, esta proporción no es muy saludable para los futuros embriones porque el exceso de espermatozoides produce productos de desecho potencialmente dañinos en los medios de FIV.

Tomando en conjunto todos estos aspectos, así como teniendo en cuenta el flujo de fluido natural que rodea a los gametos durante la fecundación, algunos grupos de investigación han intentado diseñar dispositivos que aprovechan la idea de un microcanal natural. *Funahashi, et al.*, llevaron a cabo uno de los primeros experimentos a este respecto con su llamado método de escalada sobre una pared (COW). Este experimento fue diseñado para la FIV porcina y su idea era poner una “pared” entre los ovocitos y el espermatozoides. Usando este método, su hipótesis era que sólo los espermatozoides móviles llegarían a los ovocitos. Ellos mostraron que cuando aumentaron la concentración de espermatozoides (*de 0,5 a 5,0 x 10⁵ espermatozoides/ml*), no observó un aumento en la fertilización polispermica de los ovocitos. Usando un enfoque diferente, nuestro grupo evaluó el potencial de un microcanal PDMS/canal de borosilicato para MIV, FIV y cultivo de embriones *in vitro* (CIV). Este estudio demostró que el sistema de microcanales tenía tasas de fertilización similares al grupo de control, proporcionando evidencia de que los dispositivos de microcanal podrían ser utilizados para la fertilización porcina *in vitro*.

Los mismos resultados, con una tasa de polispermia baja y alta tasa de embriones, fueron hallados por otros grupos de investigación. La posibilidad de utilizar menos espermatozoides para la fecundación animal *in vitro* podría ser muy útil si queremos utilizar espermatozoides (*sexados*) seleccionados por sexo o si las muestras de semen han afectado las concentraciones espermáticas (*oligospermia, espermatozoides congelados, espermatozoides de un macho de edad avanzada*).

Cultivo de embriones

El período de preimplantación para los embriones de ganado *in vivo* varía de 5-7 días según de la especie. Este período de preimplantación incluye el tiempo desde la fusión de gametos hasta la fijación del embrión en el útero. Durante este tiempo, los embriones no están en contacto directo con el tracto reproductivo y todos sus nutrientes son tomados de las secreciones luminales (*oviducto y útero*) en el tracto.

En el proceso *in vitro*, el cultivo de embriones y las condiciones de cultivo de embriones son dos de los temas más estudiados en el campo de la producción de embriones. Actualmente, todos estos métodos son un sustituto pobre para el oviducto con respecto al desarrollo “normal” del embrión. Ninguno de los intentos de imitar el sistema *in vivo*, han dado como resultado la misma calidad que la obtenida *in vivo*. Muchas de las diferencias entre los embriones producidos *in vitro* o *in vivo* son conocidos, incluyendo velocidad de desarrollo, metabolismo, concentración de lípidos, expresión génica, resistencia a la congelación y mortalidad embrionaria después de la transferencia.

Los protocolos estándar *in vitro* consisten de uno o más medios de cultivo que se utilizan durante el cultivo de embriones. Esto es en contraste con la situación *in vivo* en la que los embriones crecen en un líquido (*medio*) con un entorno en constante cambio.

Uno de los primeros estudios sobre cultivo microfluídico de embriones fue realizado por *Glasgow et al.* Este estudio mostró que un flujo lento era suficiente para mantener un ambiente embrionario adecuado. Además, demostró que el 82% de los embriones de ratón colocados en el dispositivo exhibían un desarrollo embrionario normal (*sin efectos adversos*). En este prototipo de dispositivo, sólo se utilizaron 200 nl de medio de cultivo dentro de un espacio rodeando al embrión de 2 mm de radio semiesférico, mientras que en la gota convencional hay 17 µl, o ~ 85 veces la cantidad de medio que hay en ese

mismo radio semiesférico de 2 mm. Un microcanal claramente tiene la capacidad de establecer microambientes para el embrión similar a lo que ocurre in vivo. También se ha utilizado un microcanal para cultivar embriones porcinos, dando como resultado el nacimiento de cinco lechones normales. En los bovinos, *Bormann et al.*, mostraron que los embriones cultivados en un dispositivo microfluídico dio lugar a un mayor número de embriones que dentro del grupo control estático. Todos estos experimentos combinados indican la viabilidad y utilidad de dispositivos de microcanales en el cultivo de embriones de mamíferos.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (1H RMN) Fecundación *in vitro*

Los medios de para la producción de embriones se formulan generalmente con exceso de nutrientes, además se sabe que el exceso de nutrientes puede tener efectos negativos en el desarrollo del embrión. Si la RMN normal se utiliza para evaluar el metabolismo de la célula, este método puede darnos parámetros para mejorar el medio *PIV* estándar. En 2016, analizamos las diversas demandas metabólicas de los gametos durante la fertilización *In vitro* y utilizamos esa información para volver a formular el medio de *FIV* de acuerdo con las necesidades requeridas por los gametos.

Estos resultados mostraron que en medios estándar de *FIV* había un exceso de piruvato y ácido láctico. El nuevo medio se reformuló con esta información y esa nueva formulación incrementó el porcentaje de embriones avanzados en cultivo (39,6 vs 30,4, $P < 0,05$).

Cultivo de embriones

En los últimos años, ha habido mucho interés en el uso de parámetros metabólicos como marcadores de la viabilidad embrionaria, esto se debe al hecho de que el metabolismo es intrínseco a la salud temprana del



Fotografía: Canadería El Tesoro

embrión y se interrumpe inmediatamente cuando los embriones son estresados. Varios trabajos muestran el poder del 1H RMN para evaluar la calidad del embrión, casi todos ellos utilizaron embriones humanos como sujetos experimentales. Por ejemplo, Nadal-Desbarats evaluó el medio desgastado de embriones humanos incubados durante dos días (días 3 y 4). En este trabajo no fueron capaces de encontrar diferencias entre embriones con crecimiento detenido y no detenido, pero mostraron por primera vez la sensibilidad de esta técnica. En otros dos estudios, se evaluaron los medios desgastados de embriones humanos después de los dos primeros días o tres días de cultivo. En estos artículos encontraron algunas diferencias entre los embriones que se fijaron y los que no pudieron fijarse.

A la luz de estos informes, nuestro laboratorio decidió evaluar el metabolismo embrionario en bovinos con RMN. La novedad de nuestro estudio fue que por primera vez se usó ¹H-NMR de muy alta sensibilidad con 750 MHz en lugar del estándar de 500 ó 600 MHz, para evaluar el medio de cultivo de los embriones.

En este estudio se realizaron tres comparaciones: 1) los embriones que se convierten en blastocistos frente a aquellos que no se convierten en blastocistos, 2) blastocistos de buena calidad frente a blastocistos de baja calidad (*embriones de FIV frente a embriones partenogenéticamente activados, respectivamente*) y 3) embriones masculinos frente a embriones femeninos].

Evaluamos el metabolismo embrionario después de las primeras 48 h de cultivo y comparamos la actividad metabólica de los embriones escindidos que se convirtieron en blastocistos frente a los embriones escindidos que no se desarrollaron a blastocistos y los blastocistos *fertilizados in vitro* (*FIV*) frente a los blastocistos partenogenéticos (*PA*). Nuestros resultados mostraron que citrato, piruvato, mio-inositol y lisina tienen un gran impacto en la predicción del desarrollo embrionario. Cuando comparamos blastocistos de *FIV* y *PA* encontramos que el acetato y las concentraciones de fenilalanina son excelentes parámetros para evaluar la calidad de los blastocistos.

Las diferencias metabólicas entre embriones masculinos y femeninos son bien conocidas: las diferentes composiciones cromosómicas sexuales conducen a la expresión génica diferencial. Nuestros resultados confirman que el metabolismo embrionario es diferente entre los sexos, además se observó que hay al menos tres fases importantes del comportamiento metabólico durante el desarrollo del embrión: 1) antes de que el genoma embrionario se establezca 2) la fase intermedia cuando hay una alta tasa de clivaje blastomérico y 3) durante la formación del blastocisto.

Además, la nueva información que obtuvimos, usando ¹H-NMR, identifica marcadores que pueden usarse para predecir el sexo del embrión. Estos resultados descubren un nuevo método no invasivo para evaluar el sexo de los embriones antes de la transferencia. 6