

Biotechnologías embrionarias aplicadas a la reproducción en la hembra

Embryonic biotechnologies applied to reproduction in the female

Emilio Espinosa Velázquez

Académico de Número de la Real Academia de Doctores de España.
e.espinosavelazquez@gmail.com

An. Real. Acad. Doct. Vol 2, (2017) pp. 144-163.

RESUMEN	ABSTRACT
<p>Abordamos las siguientes biotecnologías reproductivas: la Maduración Ovocitaria In Vitro (M.I.V.), que constituye una etapa decisiva en el proceso de producción <i>in vitro</i> de embriones; la Obtención y selección de ovocitos; La Fecundación In Vitro (F.I.V.), clave para acceder al progreso genético del animal y de la especie; La Transferencias de Embriones (T.E.), que permite intensificar la selección animal desde la hembra; La Congelación de Embriones, donde las modificaciones físicas de las células y el grado de cristalización intracelular, son el punto crítico; Las Cadenas Biotecnológicas, como la Clonación (utiliza el control del ciclo, la capacitación <i>in vitro</i>, la maduración ovocitaria <i>in vitro</i>, el diagnóstico pre-implantatorio, la congelación de embriones, la transferencia embrionaria, etc.) siendo similar lo que ocurre con la Transgenesis; La Inyección Intra Citoplasmática de Espermatozoides (ICSI), es la introducción directa de un espermatozoide en el ovocito; La Criopreservación de Ovocitos y Embriones de mamíferos, hoy</p>	<p>We address the following reproductive biotechnologies: Oocyte In Vitro Maturation (M.I.V.), which constitutes a decisive step in the process of in vitro embryo production; Oocyte collection and selection; In Vitro Fertilization (F.I.V.), key to access the genetic progress of the animal and the species; Embryo Transfer (T.E.), which allows intensification of animal selection from the female; Embryo Freezing, where the physical modifications of the cells and the degree of intracellular crystallization, are the critical point; Biotechnology Chains such as Cloning (using cycle control, in vitro oocyte maturation, pre-implantation diagnosis, embryo freezing, embryo transfer, etc.). Transgenesis; Intra-cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) is the direct introduction of a spermatozoon into the oocyte; Cryopreservation of oocytes and embryos of mammals, today, has become an integral part of assisted reproduction; The Vitrification; The Open Pulled Straw (O.P.S.); Preimplantation genetic diagnosis (DPI), which represents</p>

<p>en día, se ha convertido en parte integral de la reproducción asistida; la Vitrificación; la Open Pulled Straw (O.P.S.); El Diagnóstico Genético Preimplantatorio (DPI) que representa un progreso en la prevención precoz de enfermedades genéticas graves; El Sexaje de Embriones, que permite aumentar el porcentaje de descendientes de una hembra para ese sexo; La Clonación por Transferencia de Núcleos, la Transgénesis que permite crear un individuo que ha recibido ADN diferente al de su patrimonio genético; y finalmente las Biotechnologías Reproductivas en Acuicultura Industrial, tales como: El Control del Sexo, hembras masculinizadas (productoras de semen monosexo) y La Triploidización produciendo hembras estériles (XXX).</p>	<p>progress in the early prevention of serious genetic diseases; Embryo Sexing, which allows to increase the percentage of descendants of a female for that sex; The Cloning by Transfer of Nuclei, the Transgenesis that allows to create an individual that has received DNA different from the one of its genetic patrimony; And finally the Reproductive Biotechnologies in Industrial Aquaculture, such as: Sex Control, masculinized females (producing only X semen) and Triploidization producing sterile females (XXX).</p>
<p>Palabras clave: Biotechnología Reproducción. Maduración Ovocitaria In Vitro. Fecundación In Vitro. Transferencias de Embriones. Congelación de Embriones. Clonación. Transgénesis. Inyección Intra Citoplasmática de Espermatozoides. Criopreservación de Ovocitos y Embriones. Vitrificación. Open Pulled Straw. Diagnóstico Genético Preimplantatorio. Sexaje de Embriones. Biotechnologías Reproductivas en Acuicultura (Control de Sexo y Triploidización).</p>	<p>Keywords: Reproductive Biotechnologies. Oocyte In Vitro Maturation. Oocyte collection and selection. In Vitro Fertilization. Embryo Transfer. Embryo Freezing. Cloning. Transgenesis. Intra-cytoplasmic Sperm Injection. Cryopreservation of oocytes and embryos. Vitrification; Open Pulled Straw. Preimplantation genetic diagnosis. Embryo Sexing. Reproductive Biotechnologies in Aquaculture (Sex Control and Triploidization).</p>

1. INTRODUCCIÓN

Ninguna tecnología reproductiva podrá compararse con la importancia y el impacto que supuso hace más de 10.000 años, la domesticación y reproducción de las especies salvajes, que Solis y Selles (2005) sitúan en los siguientes momentos:

Lugar	Especie Animal	Desde hace (años)
Oriente próximo	Cabra, Oveja, Cerdo, Vaca y Caballo	10.500
China	Cerdo y Gusano de seda	9.500
Meso-América	Pavo	5.500
Andes y Amazonía	Llama y Cobaya	5.500

2. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS: ETAPAS

Si bien, es a principios del siglo XX, cuando se sitúa el inicio de la primera generación de biotecnologías reproductivas, que finaliza con el control hormonal del ciclo en la década de 1960. A partir de entonces, se consideran al menos 4 generaciones biotecnológicas reproductivas más.

Desarrollo cronológico de las Generaciones biotecnológicas de la Reproducción		
Generación	década	Acontecimientos
1 ^a	1900-1960	Inseminación Artificial; Criobiología Semen; Control Ciclo
2 ^a	1970	Transferencia, congelación y división de embriones
3 ^a	1980	Sexaje de espermatozoides y embriones. Producción in vitro
4 ^a	1990	Clonación con células somáticas
5 ^a	2000....	Transgénesis, Gen Farming, Células Madre

La biotecnología de la reproducción engloba el conjunto de técnicas que permiten mejorar la eficacia reproductiva, (Pérez y Pérez F y Pérez Gutiérrez JF., 2005, y 2008), en este documento que forma parte de mi discurso de ingreso en la Real Academia de Doctores de España (Espinosa, E. 2010), abordaremos únicamente las relacionadas con el embrión.

3. MADURACIÓN OVOCITARIA IN VITRO (M.I.V.)

La Maduración Ovocitaria In Vitro (M.I.V.), constituye una etapa decisiva en el proceso de producción *in vitro* de embriones, ya que requiere la simulación coordinada y completa de los procesos que se dan *in vivo*.

El objetivo de la MIV es suministrar ovocitos maduros, aptos para la fecundación *in vitro* (FIV) y el posterior desarrollo embrionario.

Las primeras seis horas de cultivo representan el periodo crítico, durante el cual las hormonas gonadotropas deben estar presentes y activas para iniciar una maduración meiótica completa. Las primeras seis horas corresponden, sin embargo, al periodo de “reposo”, que es cuando morfológicamente se llevan a cabo menos cambios. En contraste, las mayores transformaciones estructurales ocurren durante la segunda fase de “calma” metabólica. (Szollosi y cols., 1988).

4. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE OVOCITOS

El número de ovocitos de alta calidad recogidos por ovario es un punto clave en la producción *in vitro* de embriones. Los ovocitos empleados para MIV pueden ser obtenidos *in vivo* por vía quirúrgica (ovarios de hembras ovariectomizadas) o por laparoscopia (por medio de la técnica conocida como OPU), aunque estos métodos tienen el inconveniente de ser caros y el número de ovocitos recuperados por ovario es muy bajo.

Generalmente el material usado en la producción *in vitro* de embriones de animales domésticos procede de hembras sacrificadas, debido a que son una fuente de ovocitos muy abundante y fácil de utilizar para la producción *in vitro* de embriones a gran escala a través de la MIV-FIV (Wani, 2002). Sin embargo, el uso de ovarios procedentes de animales sacrificados en matadero implica el uso de ovocitos de hembras en estados fisiológicos muy variables y la gran mayoría de las veces desconocidos.

Tras la recuperación de los ovocitos se procede a seleccionarlos. Generalmente, esta selección se realiza en base a sus características morfológicas, basándose principalmente en las características de las células del *cúmulus* y del citoplasma.

A continuación resumimos algunos ejemplos de la selección ovocitaria, en función de las células del *cúmulus* y del citoplasma (González, 2003).

5. SELECCIÓN OVOCITARIA EN FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS Y DEL CITOPLASMA

CARACTERÍSTICAS DEL OVOCITO	AUTOR
Cúmulus completo y Citoplasma heterogéneo	Leibfried y First, 1979
Cúmulus compacto y Citoplasma homogéneo	Hazaleger y cols., 1992
Citoplasma heterogéneo	Fukuda y cols., 1993
Cúmulus compacto y Citoplasma homogéneo	Hawk y cols., 1994
Citoplasma heterogéneo	Blondin y cols., 1995
Varias capas de cúmulus	Konishi y cols., 1996
Cúmulus compacto	Moor y Trouson, 1997
Citoplasma heterogéneo	Nagano y cols., 1999
Cúmulus compacto	Cetica y cols., 1999
> de 5 capas de cúmulus y Citoplasma homogéneo	Mayes y cols., 2001

(González, 2003)

Uno de los métodos de selección de ovocitos más reciente, es el propuesto por Choi y cols., (2008) el cual se basa en la respuesta de los ovocitos a la dielectroforesis, y en la hipótesis de que los ovocitos sanos (con pleno potencial de desarrollo) y ovocitos no sanos (que carecen de potencial de desarrollo) tienen diferentes propiedades dieléctricas. Los resultados demostraron que la diferencia en la velocidad dielectroforética puede ser usada para establecer un criterio objetivo para la selección de ovocitos.

6. FECUNDACIÓN IN VITRO (F.I.V.)

Las expectativas de producción *in vivo* de embriones se han visto defraudadas con el tiempo pues su rendimiento no era tan elevado como se suponía en un principio, debido a varias causas: el número de embriones transferibles obtenidos es bajo; la existencia de hembras que no responden adecuadamente a los tratamientos para inducir una ovulación múltiple; la necesidad de respetar los periodos de descanso entre dos recogidas consecutivas y la obligatoriedad de que las donantes estén en perfectas condiciones fisiológicas y ginecológicas. (Pérez y Pérez F y Pérez-Gutiérrez JF., 2008).

La fecundación es el acontecimiento más importante e íntimo de la vida, que permite el mantenimiento de la especie. Controlando *in vitro* la fecundación, se accede al progreso genético del animal y de la especie, abriendo la puerta al desarrollo *in vitro* post-fecundación.

La FIV es una técnica que permite conocer mejor los mecanismos de la fecundación, pero también sirve para estudiar el ovocito y su maduración, la capacitación de los espermatozoides, la activación del huevo, el control del genoma embrionario, los mecanismos de la división celular, la influencia de los genomas materno y paterno, las interacciones entre el núcleo y el citoplasma, el papel de los mediadores bioquímicos establecidos entre la madre y el embrión, los mecanismos de diferenciación de los blastómeros, los fenómenos inmunológicos implicados en el mantenimiento de la gestación, etc.

La producción de embriones *in vitro* representa una de las técnicas más importantes en la biotecnología de la reproducción. Hoy día es posible extraer ovocitos inmaduros de los folículos presentes en la superficie ovárica, asegurar su maduración, fecundarlos y cultivar los embriones obtenidos, realizando *in vitro* todas las operaciones. Los embriones pueden ser utilizados tanto en programas de transferencia como para obtener citoplastos para trasplante de núcleos y producción de clones.

7. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (T.E.)

Las primeras transferencias de embriones las realizó Heape a mediados del siglo XX, desde entonces se han llevado a cabo transferencias desde el estadio de huevo, pasando por los de 2, 4, 8 o 16 células, de mórula, o de blastocisto. Por su complejidad, difícilmente puede desplazar a la I.A. como técnica de reproducción generalizada, aunque ofrece la posibilidad de intensificar la selección animal desde la hembra. La posibilidad de congelación de los embriones ha contribuido ampliamente a la extensión de esta biotecnología

Son muchos los objetivos de las T.E.: obtención de una mayor descendencia de animales de alto valor genético; obtención y venta de reproductores; obtención de descendientes de reproductores de gran valor, con problemas para una reproducción tradicional; obtención de embriones para exportación; introducción de nuevos genes en rebaños, así como recuperar patrimonios genéticos en rebaños afectados por problemas patológicos.

Una buena sincronización uterina debe existir entre donante y receptoras, debiendo ser inferior a 48 o incluso a 24 horas la diferencia entre el día del ciclo de ambas, si queremos obtener buenos resultados.

La T.E., permite desarrollar programas MOET, en los que se puede conseguir un rápido progreso genético gracias a la superovulación de las hembras donantes y al trasplante de sus ovocitos-embryones, observándose un progreso genético más rápido con los esquemas que utilizan la superovulación y la T.E., que con los métodos convencionales de testaje sobre descendencia.

8. CONGELACIÓN DE EMBRIONES

La primera congelación de embriones de mamíferos se llevó a cabo en 1952 (Smith), pero no fue hasta 1974 cuando Whittingham, obtuvo el primer nacimiento por transferencia de un embrión ovino congelado.

Para la **Congelación de embriones**, debemos seguir los principios de la criobiología, aunque en el caso de los embriones juegan un importante papel para la posibilidad de supervivencia, las modificaciones físicas de las células y el grado de cristalización intracelular.

Los movimientos y los cambios de fase del agua intracelular, así como la velocidad de enfriamiento, tienen una gran importancia. En la congelación rápida, la célula está poco deshidratada y el agua intracelular forma grandes cristales que originan lesiones irreversibles de las membranas y de las estructuras intracelulares en el momento de la descongelación. Cuando la congelación es lenta, la célula tiene tendencia a deshidratarse fuertemente, lo que limita la formación de cristales y favorece una buena supervivencia en la descongelación, aunque, si la congelación lenta continúa durante mucho tiempo, la célula se deshidrata demasiado y se produce un excesivo aumento en la concentración intracelular de electrolitos y muere la célula. Ante estas dos indicaciones contradictorias, la mejor solución es una congelación lenta, seguida de una muy rápida, lo que implica la formación de un escaso número de pequeños cristales, compatibles con la supervivencia celular. La cantidad de micro cristales intracelulares, no debe sobrepasar el umbral letal que varía para cada célula.

La velocidad de descongelación debe ser muy rápida (2.000°C. por minuto), para evitar la formación de cristales (recristalización), lo que originaría a su vez, lesiones irreversibles en la célula.

9. PERSPECTIVAS DE CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONARIA

Sería importante encontrar métodos de conservación menos drásticos para los embriones que el nitrógeno líquido, ya que la viabilidad embrionaria después de las micro manipulaciones está ya alterada, más aún si se realiza un sexaje, una

clonación, una transferencia de núcleos o se someten los embriones a programas de transgénesis.

Con el progreso de las técnicas de F.I.V. es importante desarrollar técnicas de conservación de gametos femeninos, pero el ovocito es una célula muy diferente al huevo: su citoesqueleto comprende un huso mitótico de microtúbulos cuya integridad es indispensable para mantener los cromosomas agrupados en la placa metafásica. Además, el huso es muy sensible a los descensos de temperatura, y la congelación puede originar daños irreversibles tales como la dispersión de los cromosomas o una mala migración, que origine anomalías cromosómicas y mortalidad embrionaria.

10. NUEVAS TECNOLOGÍAS EN REPRODUCCIÓN: CADENAS BIOTECNOLÓGICAS

Todas las tecnologías reproductivas que hemos abordado (transferencia y congelación de embriones, así como la FIV) permiten avanzar en reproducción animal y desarrollar nuevas posibilidades biotecnológicas de consecuencias casi imprevisibles. Actualmente, ya se consideran **cadena biotecnológica**, que integran varias técnicas, tales como la **clonación** (utiliza el control del ciclo, la capacitación *in vitro*, la maduración ovocitaria *in vitro*, el diagnóstico pre-implantatorio, la congelación de embriones, la transferencia embrionaria, los signos embrionarios de reconocimiento, métodos de diagnóstico y mantenimiento de gestación, etc.) siendo similar lo que ocurre en los aspectos relacionados con la **transgénesis**.

Aunque es difícil prever y cuantificar el impacto de todos estos avances tecnológicos, es previsible que efectos muy positivos, tanto directos como aplicados a otras especies (incluida la humana) puedan permitir mejorar la producción, avanzar en el progreso genético, luchar contra procesos patológicos, mejorar las posibilidades reproductivas, etc.

11. INYECCIÓN INTRA CITOPASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

La Inyección Intra Citoplasmática de Espermatozoides (ICSI), es la introducción directa de un espermatozoide en el ovocito después de atravesar la zona pelúcida y la membrana del ovocito (Devroey y Van Steirteghem 2004).

La primera inyección espermática con éxito, se desarrolló mediante la microinyección de espermatozoides de erizo de mar en huevos de la misma

especie (Hiramoto, 1962). Posteriormente a Uehara y Yanahimachi (1976), al trabajar con hámster, se les atribuye el primer experimento de ICSI en mamíferos. Sin embargo no fue hasta 1988 cuando se obtuvo por primera vez descendencia viva como producto de ICSI en conejos (Hosoi y cols., 1988) y dos años más tarde se consiguió el nacimiento de terneros vivos (Goto y cols., 1990).

Las primeras gestaciones en humanos producto de la ICSI, se obtuvieron en 1992 con el nacimiento de los primeros bebés. Esta técnica es considerada una de las mayores innovaciones en el campo de la reproducción asistida en la especie humana (Palermo y cols., 1992), aunque poco tiempo después Tesarik y cols., (1995; 1996) abrieron nuevas perspectivas al conseguir las primeras gestaciones y nacimientos tras la inyección (mediante ICSI) de espermátidas.

En ovino, fueron Clarke y cols., (1988) quienes aplicaron la ICSI por primera vez, observaron que la inyección de un espermatozoide completo o un núcleo espermático daba lugar a la formación de pronúcleos y la subsecuente división; Catt y Rhodes, (1995) demostraron que los ovocitos de ovino fertilizados por ICSI alcanzaban el estadio de mórulas y blastocistos, y un año más tarde Catt y cols., (1996) obtuvieron el primer cordero macho producto de fecundar por ICSI, con un espermatozoide sexado, un ovocito madurado *in vitro*.

Una variante muy importante del uso de esta técnica es la **microinyección pronuclear**, que fue la primera técnica diseñada específicamente para la transferencia de genes en la producción de animales transgénicos. La microinyección pronuclear ha generado con éxito animales transgénicos en una amplia variedad de especies de mamíferos, tales como: ratones, cerdos, ovejas, conejos, ratas, cabras y vacas (Wall, 2002).

12. CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES

La **criopreservación de ovocitos y embriones** de mamíferos, hoy en día, se ha convertido en parte integral de la reproducción asistida, principalmente en especies domésticas (Leibo y cols., 1996) y, en un apartado muy especial, en humanos. Almacenar por debajo de la temperatura crítica de -130°C da lugar a la preservación de células y tejidos por un periodo de tiempo aparentemente indefinido, sin disminuir su viabilidad. Esto se demuestra por la ausencia del aumento de incidencias de defectos, tanto genéticos como epigenéticos, en un gran número de animales domésticos nacidos de embriones o de espermatozoides mantenidos por décadas en nitrógeno líquido. Se sabe, por el contrario, que los acontecimientos que ocurren a temperaturas ultrabajas y el posterior calentamiento pueden causar lesiones letales o subletales. (Coticchio y cols., 2004). Ya en 1963, Mazur manejaba una teoría para explicar la muerte de las células expuestas a temperaturas subcero, atribuyendo los daños a la posibilidad de que el

agua congelada dentro de las células forme hielo intracelular. Además, esta teoría predice que la supervivencia de la célula puede ser máxima cuando la formación de hielo intracelular es mínima.

13. VITRIFICACIÓN

Otra biotecnología es la **Vitrificación**, cuya definición física es la solidificación de una solución (formación de vidrio) a bajas temperaturas sin que se formen cristales de hielo. (Vajta, 2000). Este concepto puede ser concebido simplemente como un aumento de la viscosidad hasta que se alcanza un estado sólido. (Checura y Seidel, 2007).

Si bien es cierto que con la vitrificación se elimina totalmente la formación de cristales de hielo, una consecuencia negativa de este método de congelación es que aumenta las probabilidades de que se den casi todas las formas de lesiones, a excepción de las causadas por la formación de cristales de hielo.

14. OPEN PULL STRAW (OPS)

Vajta y cols., (1997a; 1997b) desarrollaron esta técnica de vitrificación. El método **Open Pulled Straw (OPS)** supera los inconvenientes de la vitrificación tradicional porque consigue acelerar las velocidades de congelación y calentamiento más allá de 20.000°C/min (Vajta, 2000).

Las ventajas del método **OPS** son: a) alta velocidad de enfriamiento al emplear un volumen mínimo de medio; b) carga fácil y rápida de ovocitos y/o embriones por el efecto de capilaridad; c) contacto directo entre el nitrógeno líquido y el medio de vitrificación, lo cual aumenta la velocidad de congelación; d) calentamiento rápido y simple; e) baja toxicidad debido a que la congelación y rehidratación se realiza rápidamente, y f) menos posibilidades de rupturas de membranas tanto de ovocitos como de embriones.

15. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES

La capacidad para almacenar algunos tipos de gametos de mamíferos en nitrógeno líquido a -196°C durante un periodo prolongado de tiempo, sin que sufran algún daño o cambio, ha impulsado la investigación de métodos de criopreservación cada vez más eficientes, adaptables a una variedad cada vez mayor de ovocitos y embriones de diversas especies. Los protocolos de

criopreservación han sido adaptados, con éxito a embriones en varios estadios de desarrollo y en un gran número especies. Sin embargo, cada vez es más evidente que ciertas características fundamentales de embriones de algunas especies (p.e. en cerdos), o de embriones en ciertos estadios (p.e. las primeras divisiones en bovinos), o de ovocitos de la mayoría de especies (con la posible excepción de ratones y humanos) presentan problemas particulares para su criopreservación (Leibo y cols., 1996).

16. DIAGNÓSTICO PRE-IMPLANTATORIO (DPI)

Aunque el **Diagnostico Pre-Implantatorio (DPI)**, no se realiza aún en especies animales, el DPI permitiría determinar enfermedades hereditarias a través de cultivos de embriones in vitro. Hoy día se conocen más de 3.000 enfermedades génicas, y al menos 300 están ligadas al sexo (cromosoma X).

El **diagnóstico genético preimplantatorio (DPI)** representa un progreso en la prevención precoz de enfermedades genéticas graves, en caso de progenitores con antecedentes. La práctica del DPI puede estar influenciada por intereses económicos dominantes o simplemente por el deseo de tener niños con menos riesgos genéticos. El DPI, debería ser únicamente una técnica médica que sirva para prevenir enfermedades genéticas indiscutibles.

17. SEXAJE DE EMBRIONES

Es de gran interés zootécnico el poder elegir el sexo del recién nacido. Los bancos de espermatozoides o de embriones, sexados, presentan un indudable interés.

Actualmente, sólo la separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo presenta una eficacia real, aunque los resultados no son fiables al 100%. Este método se basa en la diferencia en ácido nucleico: los espermatozoides Y contienen de un 3% a un 4% menos ADN que los X, tanto en el morueco como en el macho cabrío. La fluorescencia de cada espermatozoide se mide por citometría de flujo, siendo cuantificada a través de un sistema informatizado, separando posteriormente los dos tipos celulares a través de un campo eléctrico. El método resulta limitado, debido al pequeño número de espermatozoides que se pueden analizar, y no es compatible con la I.A. Su coste resulta aún prohibitivo y, además, la presencia de fluorocromo en el ADN aumenta la mortalidad embrionaria.

La determinación del sexo de los embriones permite aumentar considerablemente el porcentaje de descendientes de una hembra para ese sexo. Por razones ligadas a: la técnica de transferencia; a la edad del embrión (debe

tener la zona pelúcida); a la conservación (congelación); a que el número de células del blastocisto es pequeño (120 a 160), hace que las posibilidades de biopsia y posterior sexaje, sean limitadas. Las técnicas que pueden emplearse en rumiantes, actualmente son: el análisis citogenético, la dosificación enzimática y la hibridación *in situ*.

18. CLONACION DE EMBRIONES (CE)

La supervivencia de los blastómeros depende de la zona pelúcida (estructura que debe estar presente en los primeros estadios del desarrollo) y de la posible adhesión de los blastómeros a las células epiteliales del oviducto, lo que supone una parada en su división. Un blastómero transplantado sin zona pelúcida o en una zona pelúcida muy abierta, es incapaz de desarrollarse, por lo que se emplea la técnica de Willadsen de inclusión en agar-agar para cerrar las zonas pelúcidas, habiéndose obtenido nacimientos de gemelos homocigóticos en la oveja, gracias a esta técnica.

La producción de gemelos por bisección, como método de duplicación embrionaria, es el más eficaz y económico para obtener gemelos homocigóticos, y al ser débil la supervivencia de los embriones congelados, es mejor realizar la transferencia el mismo día de la bisección, pudiendo además tomar algunas células y determinar el sexo al mismo tiempo. Tanto en ovinos como en caprinos, se han llevado a cabo con éxito experiencias de este tipo.

19. CLONACIÓN POR TRANSFERENCIA DE NÚCLEOS

El objetivo zootécnico es obtener un gran número de copias de un individuo de alto valor genético. El método es teóricamente posible, pero existen aún numerosas dificultades técnicas.

Es teóricamente posible obtener, 10, 100 o incluso 1.000 individuos idénticos a partir de uno solo, congelando embriones (hijos, nietos, etc.) que a su vez serán clonados, y así indefinidamente. Esto podría suponer un cambio radical en la ganadería del futuro, aunque también un preocupante empobrecimiento genético de la población animal. La diversidad genética entre razas e individuos es una riqueza que debemos proteger de forma prioritaria, y la clonación puede suponer un riesgo para poder mantener el suficiente polimorfismo genético de las poblaciones animales. La creación de embriotecas puede mantener las diferentes razas, pero la diversidad individual no será suficientemente salvaguardada.

Actualmente, se utiliza más el programa de clonación todo *in vitro*: maduración ovocitaria, transferencia de núcleos de blastómeros provenientes de mórulas congeladas, desarrollo embrionario hasta los 6-8 días, selección de embriones *in vitro* y trasplante de embriones en útero a hembras receptoras.

A pesar del débil rendimiento para su utilización práctica, es posible realizar la clonación de embriones. Será necesario, integrar toda la cadena tecnológica de la reproducción asistida: maduración *in vitro*, desarrollo embrionario *in vitro*, sexaje, congelación, trasplante embrionario, reproducción, seguimiento *in vivo* e *in vitro* de la supervivencia embrionaria, etc. Numerosos problemas prácticos, e incluso teóricos, deberán ser resueltos, tales como: la activación del ovocito, los mecanismos de diferenciación de los núcleos de los embriones donantes, el cultivo de las células totipotentes ES, las mortalidades embrionarias y fetales, la naturaleza de los signos embrionarios, etc.

20. PRIMERAS CLONACIONES EMBRIONARIAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS (HEYMAN Y COL. 1991)

Especie	Fase de desarrollo del embrión donante	Nacidos	Clones	Autor
Vaca	4-16 células	2	-	Prather y col., 1987
	16-64 células	92	7	Bondioli y col., 1990
	32-64 células	-	-	Simms y col., 1991
	8-64 células	101	4	Willadsen y col., 1991
	32 células		5	Heyman y col., 1993
Oveja	8-16 células	3	2	Willadsen y col., 1986
	16 células	2	-	Smith y Wilmut, 1989
	Botón del blastocisto	1	-	Smith y Wilmut, 1989
	32 células congelado	2	1	Heyman y col., 1990
Coneja	8 células	6	-	Stice y Robl, 1988
	32 células congelado	8/207	6	Heyman y col., 1990
	32 células fresco	10/139	6	Collas y Robl, 1991
	Botón del blastocisto	-	-	Collas y Robl, 1991
Cerda	4 células	1/88	-	Prather y col., 1989
Cabra	8-32 células	5/24	2	Yong y col., 1991

21. CRONOLOGÍA DE NACIMIENTO DE CLONES EN LAS DIFERENTES ESPECIES (PALMA, 2008)

Especie	Autor	Año
Ovina	Wilmur y cols.	1997
Bovina	Cibeli y cols.	1998
Caprina	Baguisi y cols.	1999
Porcina	Polejaeva y cols.	2000
Felina	Shin y cols.	2002
Leporina	Chesne y cols.	2002
Equina	Galli y cols.	2003
Mula	Woods y cols.	2003
Murina	Zhu y cols.	2003
Canina	Lee y cols.	2005

Palma, G.A., (2008). Biotecnología de la reproducción: Ciencia, tecnología y sociedad.

22. IDENTIDAD DE LOS CLONES

¿Los Clones son idénticos?, Aunque ya hemos indicado que el objetivo de la Clonación es obtener individuos idénticos a partir de uno solo, la realidad es que a priori lo son genotípicamente por el ADN nuclear, pero no lo son por el ADN mitocondrial, por transmisión materna a partir del ovocito.

23. TRANSGÉNESIS

La técnica de la Transgénesis permite crear un individuo que ha recibido una información genética nueva, como consecuencia de la introducción experimental de ADN diferente al de su patrimonio genético.

En producción animal, son previsible importantes resultados a través de la transgénesis, investigándose principalmente en los siguientes campos: mejora de las producciones animales clásicas (leche, carne, lana, huevos); aumento de la resistencia de los animales a ciertas enfermedades, y producción de proteínas de alto valor (factores de coagulación, antitripsina, etc.).

El interés de los animales transgénicos reside en la obtención de progreso genético en los rebaños, pero es conveniente ser muy prudente en la introducción de animales transgénicos en las ganaderías ya que determinados individuos (no viables, anormales, infértiles, etc.) pueden perturbar producciones consolidadas.

Es imprescindible comprobar previamente los animales transgénicos antes de su desarrollo y diseminación en razón a las posibilidades de las biotecnologías abordadas (I.A, congelación, transferencia de embriones, etc.).

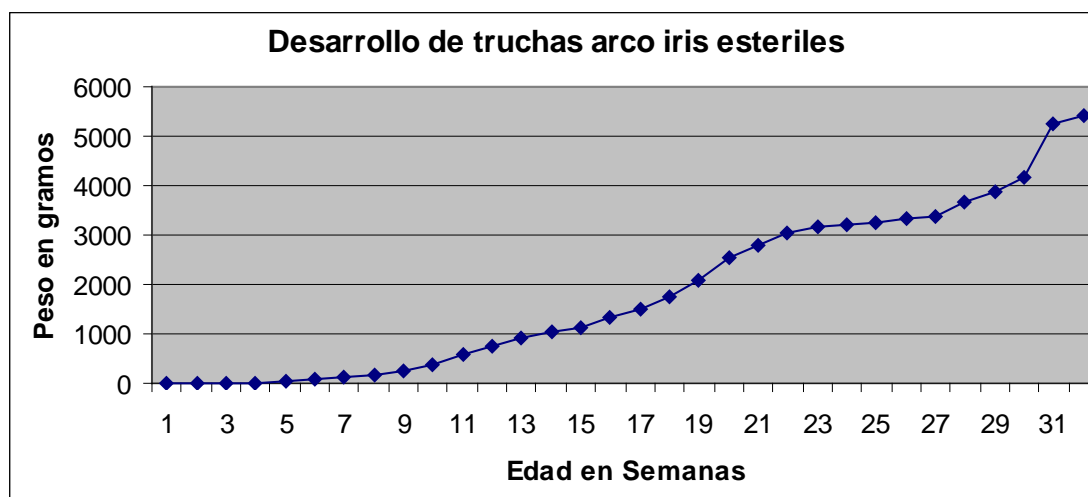
Es absolutamente necesario controlar rigurosamente todos los parámetros fisiológicos, susceptibles de ser modificados por la introducción de un transgén en el patrimonio genético de una población, ya que cualquier error podría ocasionar efectos catastróficos en el espacio y en el tiempo.

La mejora de las calidades zootécnicas de los rebaños por la introducción de animales transgénicos es aun especulativa aunque se pueden considerar algunos objetivos interesantes: aumento de la cantidad de carne en la canal; disminución del contenido en colesterol; disminución de la grasa; aumento en la producción láctea; disminución del contenido en lactosa de la leche; mejor calidad de lana o de la piel; mejor eficacia nutritiva y de conversión; etc.

Vemos que existen múltiples perspectivas para mejorar la producción animal, a través de programas de transgénesis pero, antes de su introducción en las explotaciones, hay que precisar cuáles son los genes que deben ser elegidos, cuáles son sus efectos y cómo afectan a las funciones fisiológicas relacionadas con su acción.

24. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN ACUICULTURA INDUSTRIAL

En acuicultura industrial, son las biotecnologías aplicadas a la reproducción, incubación, desarrollo y genética, las que presentan unas mayores posibilidades de actuación. La reproducción en cautividad, ha permitido la domesticación y el manejo reproductivo de numerosas especies, y ha abierto enormes posibilidades de producción.



El control reproductivo en acuicultura implica dominar la regulación y determinación del sexo y de las diferentes facetas del ciclo reproductivo, buscando un incremento en los rendimientos que permitan una optimización de la eficacia reproductiva. En algunas especies es necesario producir hembras, machos o individuos estériles, en la trucha la producción de monosexos (en general hembras) y de triploides (estériles), reduce y elimina las interacciones entre sexos y el desarrollo gonadal.

25. CONTROL DEL SEXO

En acuicultura industrial, de producción de truchas: hembras masculinizadas (neomachos productores de semen monosexo) y estériles (hembras triploides), se lleva a cabo por masculinización indirecta (con andrógenos) y por esterilización (por temperatura, presión o gas) o técnicas combinadas. El mejor periodo para la intervención endocrina, coincide con el periodo previo a la diferenciación sexual morfológica y que en los salmónidos se sitúa de la pre a la post eclosión (Piferrer and Donalson, 1993), para llevar a cabo la feminización o la masculinización, se somete a los alevines a una inmersión durante dos horas en un baño esteroide. Nosotros, para producir neomachos, vehiculamos el andrógeno (metil testosterona) al primer alimento, suministrándolo durante 3-4 meses. Mientras que la testosterona resulta ineficaz para producir la masculinización, la 11 ketotestosterona es eficaz, y andrógenos no aromáticos como la 17 α metil hidrottestosterona, inducen la masculinización sin aparente feminización (Piferrer et al., 1993).

Las hembras masculinizadas desarrollan testículos aunque por la ausencia de conductos deferentes la obtención seminal debe realizarse quirúrgicamente. La fecundación de hembras (XX), productoras de huevas (X), con neomachos (XX) productores de semen (X), daría origen a poblaciones todo hembras (XX), aunque nosotros hemos constatado la presencia de algún macho, entre la descendencia (XO?).

26. PRODUCCIÓN DE TRIPLOIDES

Para conseguir una generación monosexo (XX), se necesita previamente producir neomachos y determinar su presencia en la población, al fecundar una hembra con semen de neomacho, se obtiene una población monosexo, cuya manipulación cromosómica, permite obtener individuos triploides estériles.

Las técnicas más utilizadas consisten en someter, unos minutos después de la fecundación, las huevas de trucha arco iris (*oncorrynchuss mykiss*) a: un shock

térmico (26,5° C.); a una atmosfera de gas nitroso; o a un choque hiperbárico (9500 p./s.i.) durante diversos periodos de tiempo (desde unos minutos a 1 o 2 horas, según las diferentes tecnologías), obteniéndose índices de triploidía que varían entre un 60 (temperatura) y un 80-90% (gas nitroso y choque hiperbárico); nosotros (Espinosa y cols., 1999 y 2005) con técnicas combinadas, hemos conseguido un 100% de individuos estériles.

De acuerdo con Donaldson (1996), las manipulaciones cromosómicas tales como la triploidía, que suponen la esterilización del individuo, no suponen riesgos de hibridación en el medio natural. Nosotros (Espinosa y cols., 1999 y 2005), opinamos que son una opción importante a considerar en los programas de repoblación; mientras que otras manipulaciones (transgénesis, etc.), pueden producir modificaciones en las poblaciones del medio natural, cuyo efecto a medio o largo plazo, podría resultar imprevisible.

27. BIBLIOGRAFÍA

Blondin P., Sirad M.A.: "Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes". *Molecular Reproduction and Development* 1995; 41: 54-62.

Catt, J. W. and Rhodes, S. L. (1995) Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev*, 7, 161-166; discussion 167.

Catt, S. L., Catt, J. W., Gomez, M. C., Maxwell, W. M. and Evans, G. (1996) Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet Rec*, 139, 494-495.

Cetica, P. D., Dalvit, G. C. and Beconi, M. T. (1999) Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *Biocell*, 23, 125-133.

Checura, C. M. and Seidel, G. E., Jr. (2007) Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*, 67, 919-930.

Choi, W., Kim, J. S., Lee, D. H., Lee, K. K., Koo, D. B. and Park, J. K. (2008) Dielectrophoretic oocyte selection chip for in vitro fertilization. *Biomed Microdevices*, 10, 337-345.

Clarke, R. N., Rexroad, C. E., Powell, A. M. and Johnson, L. A. (1988) Microinjection of ram spermatozoa into homologous and heterologous oocytes. *Biol Reprod*, 38, 75.

Coticchio, G., Bonu, M. A., Borini, A. and Flamigni, C. (2004) Oocyte cryopreservation: a biological perspective. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 115 Suppl 1, S2-7.

Devroey, P. and Van Steirteghem, A. (2004) A review of ten years experience of ICSI. Hum Reprod Update, 10, 19-28.

Donaldson E.M., 1996: Manipulation of reproduction in farmed fish. Anim. Reprod. Sci. 42, 381-392.

Espinosa, E., Josa, A., Mitjana, O., Llado, E., Gil, L., Echegaray, A. (1999) Control de sexo y producción de triploides en trucha Arco Iris (*Onchorhynchus Mykiss*). Congreso Ibérico de Reproducción Animal Libro Ponencias y Comunicaciones 158-161.

Espinosa, E., Josa, A., Marti, J.I., Gil, L. (2005) Triploidy in rainbow trout determined by computer-assisted analysis, Journal of Experimental Zoology vol. 303: 12, 1007-1012.

Espinosa, E. El embrión ser vivo, Fruto de la Reproducción o de la Biotecnología, en los Animales Domésticos y en la Especie Humana. Discurso de Toma de Posesión como Académico de Número en la real Academia de Doctores de España. 23 de Junio de 2010. Depósito Legal Z-2102-2010.

Fukuda Y., Ennari N.: "Developmental ability of *in vitro* matured- *in vitro* fertilized bovine embryos derived from oocytes with homogeneous or heterogeneous ooplasm" Proc. 7th World Conf. on Anim. Prod. 1993, 2: 276- 277.

González, O. N. (2003) Producción de embriones bovinos a partir de ovarios de matadero: medios, sistemas de incubación y preservación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.

Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y. and Ogawa, K. (1990) Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. Vet Rec, 127, 517-520.

Hazeleger N.L., Stubbings R.B.: "Development potential of selected bovine oocyte cumulus complexes" Theriogenology 1992, 37 (1): 219.

Hawk H. W., Wall R.J.: "Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes" Theriogenology 1994, 41: 1571-1583.

Hiramoto, Y. (1962) Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. Exp Cell Res, 27, 416-426.

Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K. and Iritani, A. (1988) Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., 3, 331-333.

Konishi M., Aoyagi Y., Takedomi T., Itakura H., Itoh T., Yazawa S., Kishi H., Taya K., Watanabe G., Kanawa H. "Effect of active immunization of cattle against inhibin on ovarian follicular development and ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration" Theriogenology 1996 , 46:33-43.

Leibo, S. P., Martino, A., Kobayashi, S. and Pollard, W. (1996) Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. Anim Reprod Sci, 42, 45-53.

Leifried M.L., First N.L.:"Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*" Journal of Animal Science 1979, 48: 76- 86.

Mayes M.A., Sirard A.: "The influence of cumulus- oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle" Theriogenology 2001, 55: 911- 922.

Moor R.M., Trounson A.O.: "Hormonal and follicular factors affecting maturation on sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity" Journal of Reproduction and Fertility 1997; 49: 101- 109.

Nagano M., Takahashi Y., Katagiris: "*In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters" J. Vet. Med Sci 1999, 61: 531- 535.

Palma, G.A., (2008). Biotecnología de la reproducción: Ciencia, tecnología y sociedad.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A. C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 340, 17-18.

Pérez Pérez F, Pérez Gutiérrez JF, Córdova Izquierdo A. Inicio, presente y futuro de la clonación. Biotecnologías aplicadas a la reproducción animal. Editorial Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México (2005).

Pérez y Pérez F, Pérez-Gutiérrez JF., La fecundación *in vitro* y el trasplante de embriones., O Médico Veterinario 94, 12-17 (2008).

Piferrer F and Donaldson E.M. 1993. Sex control in Pacific Salmon pp: 69-77. Recent Advances in Aquaculture. Vol IV Blackwell Scientific, Oxford.

Piferrer F. Baker I.J and Donaldson E.M. 1993. Effect of natural, synthetic, aromatizable and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation

in genotypic female Chinook Salmon (*Oncorhynchus Kitsutch*). Gen. Comp. Endocrinol.,91, 59-65.

Solis, C. and M. Selles (2005). La ciencia en las sociedades arcaicas. Historia de la Ciencia (Ed. Espasa Calpe) pp.: 1191.

Szollosi, D., Desmedt, V., Crozet, N. and Brender, C. (1988) In vitro maturation of sheep ovarian oocytes. Reprod Nutr Dev, 28, 1047-1080.

Tesarik, J., Mendoza, C. and Testart, J. (1995) Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. N Engl J Med, 333, 525.

Tesarik, J., Rolet, F., Brami, C., Sedbon, E., Thorel, J., Tibi, C. and Thebault, A. (1996) Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. Hum Reprod, 11, 780-783.

Uehara, T. and Yanagimachi, R. (1976) Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol Reprod, 15, 467-470.

Vajta, G., Booth, P. J., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. (1997a) Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo Letters, 18, 191-195.

Vajta, G., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. (1997b) Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. Acta Vet Scand, 38, 349-352.

Vajta, G. (2000) Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim Reprod Sci, 60-61, 357-364.

Wall, R. J. (2002). New gene transfer methods. Theriogenology, 57, 189-201.

Wani, N. A. (2002) In Vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes: Review. Small Ruminant Research, 44, 89-95.