

## SECCIÓN VIII. BIOTECNOLOGÍA

---

---

*Co-editor: Hugo Hernández Fonseca*

- *Ecografía reproductiva*
- *Transplante de Embriones*
- *Aspiración folicular transvaginal*
- *Fecundación in vitro*
- *Clonado de animales mediante transferencia nuclear:  
aplicaciones en ganadería y biomedicina*
- *Determinación y preselección del sexo en ganadería bovina*
- *¿Es posible predecir la fertilidad en los toros?*



## Ecografía reproductiva

**Fernando Perea Ganchou, MV, M Sc**

*Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes,  
Trujillo-Venezuela. ferromi3@cantv.net*

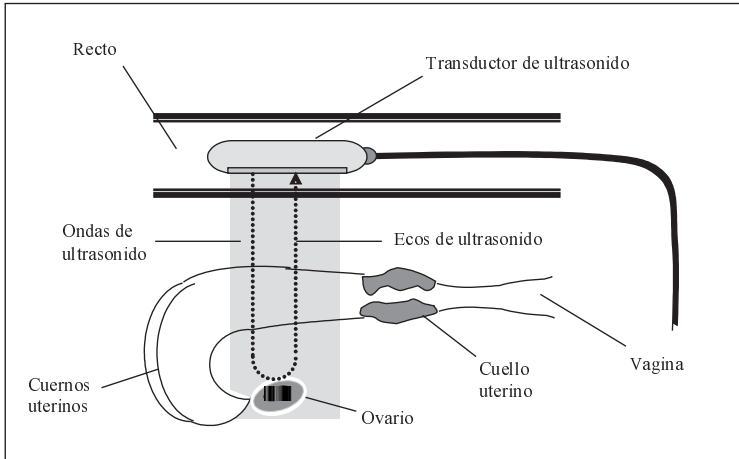
En la actualidad existen modernos recursos tecnológicos disponibles en el mercado para apoyar los programas de manejo y control reproductivo del ganado bovino. La ecografía reproductiva ha sido ampliamente utilizada en el estudio de los diferentes aspectos de la función reproductiva de la vaca, tanto en el campo de la investigación científica y en el área clínica, como en las explotaciones comerciales de animales mestizos de doble propósito (DP). Esto ha facilitado el desarrollo de un método de diagnóstico y de interpretación clínica y funcional del estado reproductivo durante el ciclo estrual, la gestación y el posparto. En la actualidad, esta tecnología constituye una valiosa herramienta para ayudar a solucionar los numerosos problemas relacionados con la reproducción de la vaca en nuestro medio. Los beneficios de su aplicación serán descritos en las páginas siguientes.

### ¿QUÉ ES Y CÓMO FUNCIONA LA ECOGRAFÍA?

La ultrasonografía o ecografía de ultrasonido en tiempo real es una valiosa tecnología ampliamente utilizada durante los últimos 25 años para estudiar y evaluar las estructuras anatómicas y el estado funcional del aparato reproductivo de los bovinos y de otras especies de interés zootécnico. Tiene la propiedad de permitir observar los órganos genitales en forma rápida, sin ocasionar daño alguno. Entre sus ventajas se encuentra la posibilidad de realizar una evaluación más exacta y objetiva del útero y ovarios que mediante la palpación rectal.

Su funcionamiento se basa en la emisión y recepción de ondas sonoras de alta frecuencia (no audibles para el oído humano) desde un transductor de ultrasonido o sonda, que se introduce en el recto a través de cuyas paredes se examinan los órganos reproductivos de la vaca (Figura 1). Los impulsos de ultrasonido son emitidos y dirigidos hacia el órgano evaluado gracias a los movimientos y variación del ángulo del transductor dirigidos por el operador. Estos impulsos viajan a través de los tejidos a

**Figura 1**  
**Emisión y recepción de ondas de ultrasonido desde un transductor hacia los órganos reproductivos de la vaca**



una velocidad constante hasta encontrar un órgano en cuya superficie “rebotan” y regresan en forma de eco al transductor.

Como resultado de este mecanismo se forma una imagen dinámica en la pantalla del monitor del equipo (muy semejante a la pantalla de un televisor) que muestra una delgada y profunda área, como si fuera una “rebanada”, de la estructura o tejido que se está evaluando. Esta imagen se observa en la pantalla de acuerdo a la densidad o dureza del tejido examinado, en una variedad de tonos que van desde el negro (color como se observan los líquidos) al blanco (los huesos y tejidos muy densos), incluyendo una amplísima gradación de tonos grises (cuerpo lúteo, estroma ovárico, etc.).

Las frecuencias más comúnmente usadas en la evaluación de los órganos reproductivos de grandes animales como la vaca son 3,5, 5,0 y 7,5 MHz. Las estructuras relativamente pequeñas, como los folículos ováricos localizados más próximos del transductor se pueden estudiar con una frecuencia entre 5,0 y 7,5 MHz. Por el contrario, grandes estructuras localizadas cerca del transductor tales como fetos y úteros de mediana y avanzada gestación, se observan mejor con frecuencias de 3,5 MHz.

## **APLICACIONES CLÍNICAS DE LA ECOGRAFÍA EN LA REPRODUCCIÓN BOVINA**

Debido a la gran variedad de aplicaciones clínicas, la ecografía es una invaluable herramienta que ofrece un soporte tecnológico a los programas de control y manejo reproductivo de las fincas como se observa en el siguiente Cuadro:

## Ventajas y desventajas de la ecografía reproductiva para los ganaderos y veterinarios

Ventajas	Desventajas
Es una herramienta tecnológica portátil fácilmente transportada al lugar de trabajo	Es un equipo costoso
Permite “ver” lo que antes solo podía percibirse a través de tacto	El usuario requiere entrenamiento para operar el equipo e interpretar la imagen ecográfica
Mejora notablemente la precisión del examen ginecológico rutinario	Para garantizar la seguridad del ecógrafo es recomendable que los animales examinados sean inmovilizados en un brete
Posibilita el diagnóstico de alteraciones reproductivas difíciles de detectar por medio de la palpación rectal	El equipo, particularmente la sonda transrectal, requieren un cuidado especial
Permite determinar el sexo fetal y diagnosticar la gestación precozmente, etc, imposible de llevar a cabo con los métodos convencionales	La inversión no es fácilmente recuperada, especialmente por veterinarios en el ejercicio libre
En general mejora la eficiencia y calidad del servicio veterinario	

## USOS PRÁCTICOS DE LA ECOGRAFÍA DE ULTRASONIDO EN TIEMPO REAL

1. Determinar el estado funcional de los ovarios (ciclicidad, anestro, momento del ciclo estrual, etc.) con el fin, por ejemplo, de decidir cual será el tratamiento de sincronización de celo es más indicado.
2. Confirmar la respuesta ovulatoria a un tratamiento terapéutico; como por ejemplo, diferentes esquemas de sincronización del celo, tratamientos para vacas repetidoras, etc.
3. Diferenciar la aciclicidad ovárica causada por la persistencia de un cuerpo lúteo y la debida al anestro orgánico.
4. Determinar el momento óptimo para aplicar un tratamiento luteolítico.
5. Comprobar la respuesta de un tratamiento luteolítico (Ejem: casos de piometra).
6. Evaluar la respuesta a un tratamiento superovulatorio.
7. Valorar potenciales hembras donadoras y receptoras de embriones.
8. Identificar el momento de la pubertad en novillas.
9. Diagnóstico precoz de la gestación a partir de los 26 días (precisión del 98%).
10. Determinar la muerte embrionaria precoz
11. Determinar el sexo fetal entre los 55 y 75 días de gestación (95% de exactitud).
12. Evaluar la viabilidad embrionaria y fetal.
13. Diagnóstico de gestaciones gemelares.
14. Monitorear la aspiración folicular de ovocitos para fertilización *in vitro*.

15. Diagnóstico de patologías ováricas (quistes foliculares y luteales, tumores ováricos).
16. Diagnóstico de patologías uterinas y del oviducto (hidrosalpinge, endometritis, piometra, hidrometra, quistes y tumores uterinos).
17. Evaluación de la involución uterina.
18. Valoración ginecológica de vacas con parto distócico y/o retención placentaria.

## **¿CUÁL ES EL PROCEDIMIENTO PARA PRACTICAR UN EXAMEN ECOGRÁFICO?**

El procedimiento para efectuar un examen ecográfico en la vaca es similar al que se realiza durante la palpación rectal; la diferencia radica en que la exploración se hará por medio del transductor de ultrasonido y no a través del tacto mediante la habitual palpación rectal.

En muchos casos es necesario extraer el material fecal de la ampolla rectal antes de la evaluación para evitar que este se interponga entre el transductor y la mucosa del recto. De esta forma se evitarán interferencias y distorsiones en la imagen ecográfica. Es recomendable aplicar un lubricante hidrosoluble (gel ecográfico de contacto) sobre la superficie del transductor para mejorar el contacto entre este y la pared rectal.

Algunos especialistas recomiendan no manipular el tracto reproductivo antes o durante la evaluación genital, para evitar cambiar la posición o distorsionar la forma de la estructura reproductiva monitoreada. En todo caso, dicha manipulación será menor a medida que el operador adquiera más experiencia en el manejo del equipo.

Es importante inmovilizar el animal en un brete o cepo para evitar movimientos que pudieran interferir con la evaluación ecográfica, a la vez que se garantiza la integridad del equipo.

Finalmente, se debe tener en cuenta que la calidad de la imagen ecográfica es el resultado de la interacción de 4 factores: operador, máquina, ambiente y animal. No obstante, para lograr la máxima exactitud y confiabilidad en el estudio, es la experiencia en el manejo del equipo y la correcta interpretación de la imagen ecográfica el aspecto más importante.

## **LECTURAS RECOMENDADAS**

Arnez CR, Bates TB. *Ultrasonography: An introduction to normal structure and functional anatomy*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. 1995.

Ginther OJ. *Ultrasonic imaging and animal reproduction: Fundamentals*. Equiservices Publishing, Wisconsin, USA. 1995.

Ginther OJ. *Ultrasonic imaging and animal reproduction: Cattle*. Equiservices Publishing, Wisconsin, USA. 1995.

Kahn W. *Veterinary reproductive ultrasonography*. Hannover Mosby-Wolfe. London, England. 1994.

Perea GF, Cruz AR. Usos de la ultrasonografía en la evaluación reproductiva de la vaca. En: *Reproducción Bovina*. González-Stagnaro, C (ed). Fundación GIRARZ. Edic. Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela. Cap XXIII: 357-372. 2001.

Perry RC, Beal WE, Corha LR. Monitoring ovarian structures. *Agri-Practice* 11 (4):28-32.

ESSAOTE, *AQUILA*

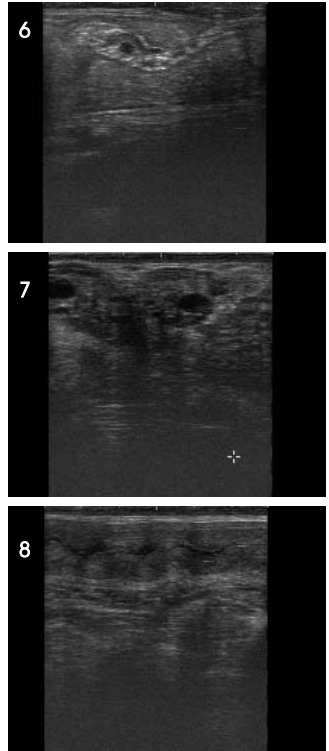
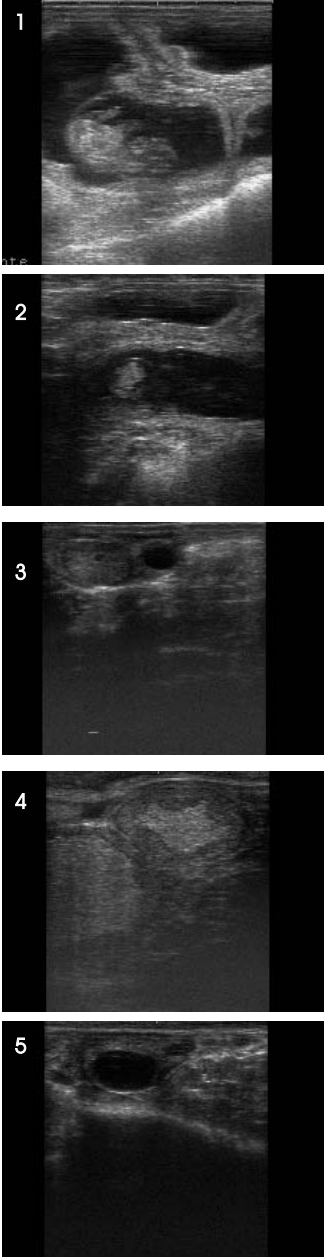


PIE MEDICAL, *100 VET FALCO*



PIE MEDICAL, *TRINGA*





1. Gestación de 48 días
2. Gestación de 33 días
3. Ovario con cuerpo lúteo (izquierda) y folículo (derecha)
4. Piómetra en cuernos uterinos
5. Folículo ovulatorio
6. Ovario, mesovario y mesosalpínge
7. Ambos ovarios en una imagen
8. Imagen longitudinal del cuerno uterino con un pequeño lumen en su interior



## Transplante de Embriones

**Rumualdo González Fernández, MV, ERA**

*Venezolana de Inseminación Artificial y Transplante de Embriones*

*Tel: 0263-4512893; 0414-9630533*

*viateca11@cantv.net - www.viateca.com*

El Transplante de Embriones (TE) es una técnica que consiste en recolectar embriones mediante el lavado del útero de una hembra (donadora) para su posterior colocación en el útero de otra hembra (receptora), donde se desarrollará la gestación. El trabajo se inicia con la superovulación de la donadora, a la cual se le administra hormona FSH dos veces diarias (mañana y tarde) durante cuatro días. Dos o tres días después de iniciado el tratamiento con FSH se aplica una prostaglandina F2 $\alpha$  sintética o sus análogos con el objeto de inducir el celo el cual será complementado con una o dos inseminaciones con un intervalo de 12h. La superovulación se inicia 8-10 días después del último celo en presencia de un cuerpo luteo (CL) o el quinto día después de haber colocado un dispositivo intravaginal o subcutáneo conteniendo progesterona.

Alrededor de 6½ a 7 días después de la inseminación artificial de la donadora, se realiza el lavado del tracto reproductivo; en ese momento, ya los huevos han alcanzado el útero después de su fertilización a nivel de trompas. Previo al lavado los animales son inmovilizados, lo que es complementado con la aplicación de anestesia epidural utilizando 5 ml de lidocaina al 2%. Mediante manipulación a través del recto se introduce en el interior del útero una sonda de Foley N° 16 ó 18 de dos vías que posee un balón de 5-30 ml. A continuación, los cuernos uterinos son lavados de manera intermitente con 30-60 ml de una solución salina enriquecida estéril, la cual es introducida y drenada por gravedad o mediante presión y succión simultánea utilizando una jeringa desechable de 50 ml.

Durante la recolección, la solución drenada atraviesa un filtro especial para separar los embriones. Al final del lavado, una pequeña porción del líquido concentrado y retenido en el filtro, es vertida en placas de petri desechables (100mm x 20mm). Para la búsqueda de los embriones se emplea una lupa estereoscópica (40X). Los embriones seleccionados e identificados son transferidos a otras placas de petri redondas

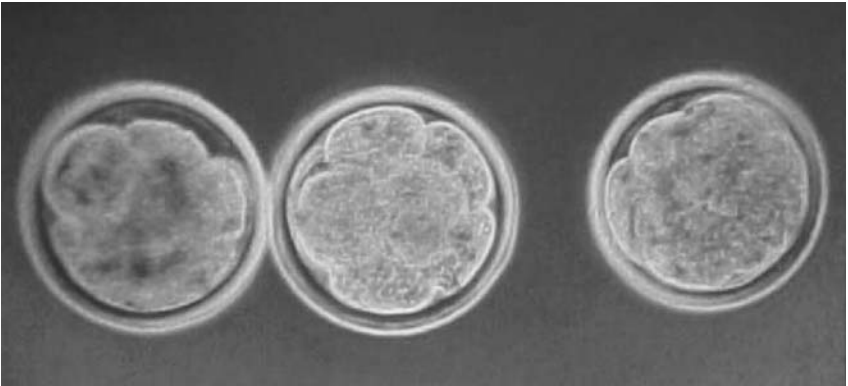
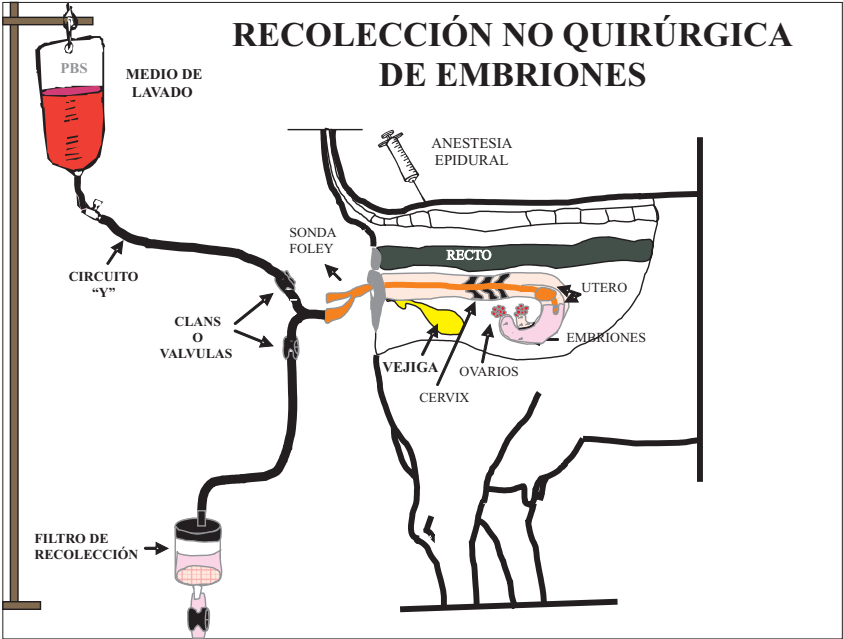
(40mm x 10mm) conteniendo medio de mantenimiento. Los embriones considerados de buena calidad (transferibles) son montados en pajuelas de plástico estériles de 0,25 ml (mini pajuelas) para su posterior transferencia o almacenamiento en nitrógeno líquido.

Los embriones son transferidos por vía vaginal en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo luteo previamente detectado por palpación rectal en receptoras que 6½ -8 días antes habían exhibido celo natural o sincronizado. La receptora inmovilizada en un brete o manga estrecha se le aplica una inyección epidural de anestésico similar procedimiento que el empleado en las donadoras. La pistola para el trasplante es muy parecida a la utilizada en la inseminación artificial con la diferencia de ser algo más larga y fina, siendo la funda externa en su extremo anterior, metálica o de plástico resistente. Después de traspasar el cervix, el extremo de la pistola es dirigido cuidadosamente hacia el interior del cuerno (del mismo lado en el cual se encuentra el cuerpo lúteo de la ovulación) depositando el embrión en el segundo o último tercio de su longitud. Cuando el embrión es depositado en el cuerno uterino opuesto al cuerpo luteo (contra lateral), la fertilidad se reduce significativamente.

## EXPERIENCIAS EN LA GANADERÍA DOBLE PROPÓSITO

Las primeras experiencias de trasplante de embriones en la ganadería doble propósito en Venezuela fueron realizados en 1979 por R. González y su equipo. A partir de 1981 se instala el primer laboratorio de Trasplante de Embriones en el país y un año más tarde nace el primer ternero producto del trasplante directo de un embrión congelado. Posteriormente, se realizaron numerosos trabajos de investigación utilizando como donadoras vacas mestizas cebú x razas lecheras, transfiriendo los embriones en novillas receptoras del mismo tipo racial. El promedio de producción de embriones transferibles (ET) ha sido de 6,3 por donadora lavada. Uno de los principales problemas reportados en este tipo de ganado ha sido la gran dificultad para atravesar el cervix durante el procedimiento de recolección y colocación de los embriones comparado con la mayor facilidad en las hembras de razas lecheras (*Bos taurus*). En razón de esta limitante, antes de proceder se recomienda practicar un examen cuidadoso del cervix incluyendo la prueba de permeabilidad del canal cervical. En igual forma, ha sido demostrado un efecto estacional durante el año, al observar que durante el periodo seco (verano), la producción de embriones resultó significativamente superior (>20%) respecto a la época húmeda (invierno).

Los porcentajes de fertilidad (Nº de animales preñados/ Nº de trasplante x 100) utilizando embriones frescos resultan comúnmente más altos (> 60%) que los embriones congelados (40-50%). Para lograr una mayor tasa mayor de preñez con embriones congelados se recomienda seleccionar aquellos de mejor calidad para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido, utilizando etilenglicol ó glicerol como sustancias crioprotectoras.



Embriones Transferibles de 7 días de edad

## LECTURAS RECOMENDADAS

- Brand AM, Aarts H, Zaayer D, Oxender WD. Recovery and transfer of embryos by non-surgical procedures in lactating dairy cattle. In Control of Reproduction. pp. 281-291. Ed. J. M. Srenau Martiorus Nijhoff. The Hague, 1978.
- Donaldson LL.E. Embryos, production in superovulated cows: transferable embryos correlated with total embryos: *Theriogenology*, 21 (4) : 517-525, 1984.
- Drost MA, Brand AM, Aarts, H. A device for non-surgical recovery of the bovine embryos. *Theriogenology*. 6 (5). 1976.
- González R. Avances sobre el transplante de embriones en Ganado Mestizo. Ieras JONIRA. Maracaibo-Venezuela. 1972.
- González R. Comparación de dos métodos de sincronización del estro con Prostaglandina F2á en receptoras mestizas cebú. Mem. I Jornadas de Investigación, Facultad de Veterinaria, Universidad del Zulia. Maracaibo. 1984.
- González R, Soto E, Bohórquez R. Ensayos preliminares sobre superovulación y recolección de embriones en vacas mestizas. Hda. "El Capitan" Machiques. Sem Facultad de Veterinaria, Universidad del Zulia. 1979.
- González R, Soto E, Bohórquez R. Patency of cervical canal in crossbred female Zebu x Brown Swiss selected for non-surgical recovery or transfer of embryos. *Theriogenology* 19 (5): 1983.
- González R, Soto E, Bohórquez R. Pregnancy rate in crossbred recipients Zebu x Dairy Breeds) synchronized with Norgestomet (Abst.) *Theriogenology* 21 (1). 1984.
- Kitto G.P. Tips Considerations in embryo transfer. *Theriogenology*. 21 (4): 1985.
- Massip A, Vanderzwalen P, Ectors F, De Coster RD, Ieterm G, Hansen, C. Deep freezing of cattle embryos in glass ampule or French straws. *Theriogenology* 12: 79-84. 1985.
- Sugie T, Soma T, Fukumitsu S, Otsuki K. Studies on the ovum transfer in cattle with special referente to colecction of ova by means of nonsurgical techiques. *Bull. Nat. Inst. Anim. Ind.* 25: 27. 1972.

## Aspiración folicular transvaginal

**Héctor Nava-Trujillo, MV<sup>1</sup>, Hugo Hernández-Fonseca, MV, PhD<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Programa de Reproducción Bovina. División de Estudios para Graduados, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.*

<sup>2</sup>*Catedra de Fisiología de los Animales Domésticos, Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela ~ hectornava00@hotmail.com*

Los grandes avances en el área de la reproducción animal como son la fertilización *in vitro*, la clonación y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides tienen en común la necesidad de utilizar ovocitos de alta calidad o capacidad de desarrollo, factor que es clave para lograr una alta eficiencia de estas tecnologías.

En el caso de la producción *in vitro* de embriones (PIV), los ovocitos en la mayoría de los casos provienen de ovarios obtenidos en mataderos y aunque estos representan la fuente más abundante de ovocitos, no garantizan la calidad necesaria para obtener de manera constante altas tasas de blastocistos. Tampoco se garantiza que estos ovocitos provengan de hembras de alto valor genético (a menos que estas sean conocidas previamente) o libres de enfermedades, lo que cobra gran importancia si se toma en cuenta la mayor persistencia de los patógenos que se adhieren a la zona pelúcida de los embriones producidos *in vitro* a los lavados de tripsina a que son sometidos a fin de garantizar su inocuidad.

Entre un 50 y 70% de los ovocitos obtenidos son aptos para la fertilización *in vitro*, alrededor del 90% de estos son fertilizados y entre el 20 y 40% alcanzan el estadio de blastocisto. Por lo tanto, mantener una fuente constante de ovocitos de alta capacidad de desarrollo, alto valor genético y máxima calidad sanitaria es uno de los puntos claves para garantizar un sistema comercial de producción *in vitro* de embriones.

El 95% de los embriones transferidos a nivel mundial son producto de superovulación; sin embargo, el número de embriones producidos por tratamiento superovulatorio es altamente variable dependiendo de la raza de la donante, de los tratamientos superovulatorios previos, de la hormona superovulatoria a utilizar y del día del ciclo en que se inicie el tratamiento, entre otros. En el mejor de los casos se

pueden realizar 6 tratamientos por vaca/año (a intervalos de 2 meses) y se obtienen en promedio unos 6 embriones transferibles por tratamiento, lo que representa unos 36 embriones por vaca/año y unos 18 becerros nacidos, asumiendo un 50% de preñez.

Ante esta situación, la obtención de ovocitos de una hembra viva mediante la aspiración folicular transvaginal representa la alternativa más viable para lograr satisfacer las necesidades de ovocitos de un sistema de producción de embriones. Esto es probablemente debido a que combina lo mejor de diversas tecnologías como la superovulación, la ultrasonografía y la producción *in vitro* de embriones. Además, la aspiración folicular transvaginal es una técnica confiable, poco invasiva y con gran repetibilidad.

## ¿EN QUÉ CONSISTE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR TRANSVAGINAL?

Mejor conocida por sus siglas en inglés, OPU (Ovum Pick-up), la aspiración folicular transvaginal es una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son recolectados de los folículos en los ovarios de una vaca viva por aspiración guiada mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal. Esta técnica fue aplicada por primera vez en bovinos en 1988 al adaptar para tal fin los procedimientos de búsqueda ultrasonográfica transvaginal utilizados en humanos y aparece como una solución luego de intentos previos de aspiración de folículos en vacas vivas mediante técnicas como la laparotomía y la laparoscopia.

## LA TÉCNICA DE OPU

Para llevar a cabo esta técnica de aspiración folicular *in vivo* se requiere contar con un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial, una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja. La sonda ultrasonográfica para OPU ha sido construida con la finalidad de que permita la manipulación de la aguja desde el exterior del animal y que el transductor esté en contacto con los ovarios; de ese modo, el extremo de la aguja pueda ser visualizado cuando penetra dentro de los folículos que serán aspirados. La aguja está conectada a la bomba de vacío por medio de una tubería plástica o de silicona, lo que permite que el contenido folicular sea vaciado directamente al filtro, que es similar al utilizado para la recolección de embriones.

En primer lugar, al iniciar el trabajo, las hembras a utilizar deben ser sedadas con xilazina y además deben recibir anestesia epidural con lidocaina al 2% (3-5 ml/vaca), luego de esto se debe proceder a limpiar y desinfectar la vulva y el perineo. Una vez realizada la higiene, se procede a introducir el transductor que tiene acoplado el sistema de guía de la aguja. No es necesario introducir la mano por la vagina para tal fin. La cabeza del transductor debe ubicarse en cualquiera de los lados del cervix, según sea el ovario a puncionar. Luego se introduce la mano izquierda por el recto y se fija el ovario contra la cabeza del transductor, lo que permite visualizarlo en la pantalla del equipo de ultrasonografía, al igual que a los folículos y la aguja. A su vez en la pantalla del ultrasonografo podemos apreciar la trayectoria de la aguja lo que nos permite ubicar los folículos para lograr una aspiración exitosa. Una vez ubicado el folículo a aspirar, se impulsa la aguja suavemente para que penetre la pared vaginal y luego la folicular; una vez logrado esto la bomba de vacío aspira el conteni-

do y lo deposita en el filtro de embriones o en el recipiente destinado para tal fin. En cualquiera de los casos estos debe contener medio de aspiración heparinizado (PBS + 10% de suero fetal bovino). Posterior a esto los ovocitos son procesados igual que para fertilización *in vitro*.

## EL USO DE LA OPU

La OPU permite incrementar de forma significativa, el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca al año, dada la posibilidad de reutilizar las vacas donantes de ovocitos a intervalos mucho más cortos en comparación con la técnica de superovulación y en comparación con la utilización de ovarios de matadero. La técnica permite realizar hasta dos sesiones de aspiración por donante a la semana, obteniéndose en promedio unos 4,1 ovocitos/vaca/sesión. Además, este número puede llegar a 10,4 ovocitos/vaca/sesión, si las donantes son tratadas previamente con hormona foliculo estimulante (FSH) y somatotropina (bST), por lo que se pueden llegar a obtener entre 50 (sin estimulación hormonal) y 100 (con estimulación hormonal, FSH+bST) becerros por vaca donante al año. Esto representa entre 3 a 4 veces el valor logrado con la transferencia de embriones clásica. Los resultados pueden estar afectados por factores como el diámetro de la aguja de aspiración, la presión de aspiración, el momento del ciclo estral en que se realice la aspiración, edad, raza y condición corporal de la donante, así como el uso de estimulación hormonal.

Además, la OPU permite incorporar hembras donantes que se rechazarían en los procedimientos de superovulación por razones de dificultades anatómicas en el cérvix como a una falta de respuesta o a una disminución progresiva de la respuesta al tratamiento superovulatorio. También pudiera ser que se trate de hembras que sean infértiles y que continúen vacías luego de cuatro o más servicios. No debe pasarse por alto la posibilidad de incorporar como donantes de ovocitos a hembras jóvenes e inclusive pre-púberes, lo que nos permitiría no solo acortar el intervalo generacional sino también acelerar las pruebas de progenie para la evaluación genética de sementales. Por supuesto que para esto es necesaria aún mucha investigación.

Es importante resaltar que el uso de esta técnica no esta restringida a bovinos y ha sido aplicada en diversas especies como son equinos, rumiantes silvestres y búfalos, además de representar una herramienta importante en la recuperación de especies en peligro de extinción. Otro uso potencial de la OPU es la posibilidad de aplicar tratamientos hormonales directamente en el ovario. Tal es el caso de la inyección intraovárica del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), que permite incrementar la capacidad de desarrollo de ovocitos aspirados de ovarios de hembras pre-púberes.

En conclusión, la aspiración folicular transvaginal es un procedimiento que permite la recuperación repetida de ovocitos de donantes vivas, siendo una técnica de alta eficiencia y repetibilidad, lo que permite al combinarla con la fertilización *in vitro* superar con creces el número de becerros obtenidos por donante en un periodo fijo de tiempo en comparación con la superovulación. La aplicación de esta técnica puede, además, incrementar el número de donantes de ovocitos entre las cuales se podrá contar con hembras pre-puberales, lo que permitiría reducir el intervalo generacional y así incrementar el progreso genético.

## LECTURAS RECOMENDADAS

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55:1341-1357, 2001.

Hernández-Fonseca H. Fertilización in vitro. En: *Reproducción Bovina*. C González-Stagnaro (Ed). Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI: 411-426, 2001.

Oropeza A., Haderer KG, Herrmann D, Wrenzycki C, Niemann H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian IGF-I application. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16(1,2): 243 (Abstract). 2004.

Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762, 1988.

Simon L, Bungartz L, Rath D, Niemann H. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanently rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology* 39: 312 abstract, 1993.



## Fecundación *in vitro*

Hugo Hernández Fonseca, MV, MSc, PhD

*Cátedra de Fisiología Animal, Departamento de Biología Animal  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia.  
Maracaibo-Venezuela ~ hjhernan@cantv.net*

El fenómeno o proceso a través del cual el espermatozoide o célula masculina es capaz de unirse y penetrar la célula femenina u óvulo para formar un nuevo individuo bajo condiciones de laboratorio (fuera del organismo animal) se conoce como *fecundación "in vitro"* (FIV). La habilidad de imitar exitosamente este proceso biológico en el laboratorio esta basada en años de estudio y experimentación. En la actualidad, luego de la producción de Virgilio (primer becerro *in vitro* del mundo en EEUU por el equipo de Benjamín Brackett en 1981) y a 4 años de los primeros becerros *in vitro* nacidos en Venezuela logrados por el equipo de Hugo Hernández, podemos afirmar que han existido suficientes experiencias experimentales, a campo y comerciales, que permiten al FIV comenzar a asistir al productor agropecuario en la difícil tarea de incrementar la producción de proteínas de origen animal.

La fecundación *in vitro* permite que el semen del toro o sementales de casi cualquier especie doméstica, pueda penetrar y fecundar el óvulo de la vaca u otra hembra. El semen del toro debe ser preparado al igual que el óvulo de la vaca para que ocurra la fecundación dentro de envases plásticos estériles (placas de petri) en el laboratorio. Los embriones resultantes permanecen embebidos en medios de cultivo líquidos enriquecidos con nutrientes que el embrión necesita para desarrollarse y crecer. Debemos entender que el producto de estas fecundaciones en el laboratorio es un conceptus o embrión que permanecerá en la placa de petri por 7 a 8 días, antes de ser utilizado (congelado, transferido, desechado o estudiado).

En los actuales momentos, no existe la tecnología suficiente para lograr la capacidad de mantener el embrión en condiciones *in vitro* ideales como para permitir al embrión que se desarrolle hasta que este se convierta en feto o en un becerro. De manera tal, que esta tecnología solo nos permite ejercer un control sobre las condiciones de formación, crecimiento y desarrollo de embriones bovinos durante la primera se-

mana de vida, donde se han comprobado signos de viabilidad de este embrión antes de transferirlo a una vaca. La FIV nos permite además, masificar el proceso de producción de embriones (200-400 embriones/semana/técnico). La FIV fácilmente se acopla a otras tecnologías como la aspiración de óvulos de vacas seleccionadas (OPU), para de esa forma, multiplicar los beneficios en cuanto a la calidad genética de los embriones obtenidos.

## ETAPAS DE LA FIV

La FIV comprende tres etapas:

1. Maduración del óvulo o gameto femenino.
2. Fecundación propiamente dicha.
3. Cultivo embrionario

**Maduración.** Consiste en propiciar la progresión en el desarrollo del óvulo de la vaca o novilla, una vez obtenido de ovarios de matadero o animales vivos por aspiración transvaginal. Esto se logra colocando estos óvulos en medios enriquecidos y suplementados con hormonas, como la hormona foliculo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) o los estrógenos ( $E_2$ ) durante un periodo de 24 horas.

**Fecundación.** Consiste en incubar los óvulos madurados (producto de la fase anterior) con espermatozoides vivos y móviles durante un periodo de 6 a 24 horas, luego de un proceso de selección y capacitación espermática que nos permitirá a su vez de deshacernos de componentes del plasma seminal, crioprotectores y espermatozoides muertos o con escasa vitalidad. La capacitación espermática generalmente se logra exponiendo los espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína, entre otras. Estas sustancias logran estimular el proceso de capacitación del espermatozoide que lo prepara para interaccionar y fecundar el óvulo.

**Cultivo.** Aquellos embriones de 4 o más células resultantes de la FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar a mórulas y blastocistos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco) o congelados para su posterior uso. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diversas fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales.

## APLICABILIDAD DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA GANADERÍA

El establecimiento y la adopción de una nueva tecnología en nuestros sistemas de producción bovina de leche y carne estarán probablemente determinados por la existencia de condiciones y prerequisites, entre los cuales se contarían los siguientes:

**Tecnología Eficiente.** La FIV ha venido superando obstáculos desde los años 70. Hoy día por cada 100 óvulos colocados a madurar se puede esperar que más del 90% alcance el estadio de Metafase II o estadio en el que puede ser fecundado por el espermatozoide. De esos maduran más de 90 óvulos para luego de la fecundación inicia-

rán su división celular aproximadamente de 50 a 70 óvulos. De estos óvulos fecundados, 20 a 40 llegan a ser embriones (blastocistos) transferibles.

**Costos por debajo de ingresos.** La FIV garantizará bajos costos en la medida que el número de óvulos sea alto, constante y de apropiado valor genético, de manera de masificar la producción de embriones por semana (400 embriones/técnico). La combinación de FIV con otras tecnologías como el sexaje de embriones, semen sexado, ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) o la aspiración transvaginal de óvulos aunque aumentan los costos, en general, incrementará mucho más el valor del embrión producido.

**Técnica probada bajo condiciones comerciales.** Aun cuando la FIV no se aplica ampliamente a nivel mundial (sólo el 7% de los embriones transferidos son producidos *in vitro*), ha demostrado ser comercialmente aplicable en países como Canadá y Brasil.

**Simplicidad en su aplicación.** La aplicación de la FIV no impone exigencias adicionales sobre el sistema de producción diferente a las exigidas por otras tecnologías como la inseminación artificial y la transferencia embrionaria.

**Flexibilidad para insertarse en el sistema.** La producción *in vitro* de embriones se podría llevar a cabo usando óvulos provenientes de ovarios de matadero, de óvulos aspirados de animales élite sin necesidad de sacrificarlos o con óvulos adquiridos a empresas especializadas a nivel mundial. Los espermatozoides pueden provenir de semen fresco o congelado. La FIV puede producir embriones con gametos de cualquier raza y suele obedecer la selección del productor.

**Accesibilidad de equipos, asesoramiento técnico y repuestos.** Todos los equipos y reactivos utilizados en FIV son normalmente utilizados en laboratorios clínicos y de investigación, y aunque no son normalmente producidos en el país, si pueden ser adquiridos a través de representaciones locales.

**Publicidad y Educación.** Es vital que el potencial usuario y la comunidad donde ha de insertarse conozcan las expectativas reales de su aplicación.

## **BENEFICIOS DE LA APLICACIÓN DE FIV**

- Los beneficios de alguna tecnología siempre deben cuantificarse económicamente cuando se aspira que la misma tenga impacto en la ganadería nacional, aspecto este que en ocasiones los investigadores olvidan y que termina perjudicándolos con las dificultades para la consecución de fondos para la investigación científica. Sin embargo, cuando se habla del aspecto económico no necesariamente hay que referirse a la inversión inicial, sino a los flujos de caja a ser generados en los años subsiguientes.
- La FIV posee nichos de aplicación donde su éxito será más probable. Por supuesto, que las empresas agropecuarias o fincas donde ya se aplique alguna otra tecnología como la inseminación artificial o se lleve un control reproductivo confiable, y exista a la vez una gerencia entusiasta y comprometida con el proceso productivo, probablemente constituyan lugares apropiados para la aplicación de esta tecnología.

- La FIV realmente no tiene exigencias adicionales a las establecidas por la IA o la Transferencia Embrionaria (TE), dado que el embrión *in vitro* se realiza en un laboratorio de FIV y sólo se lleva el embrión a la finca dentro de una pajuela idéntica a las usadas para semen. Este embrión será almacenado en tanques de nitrógeno líquido igual que el semen.

En conclusión, podemos señalar que la fecundación *in vitro* (FIV):

- Constituye una tecnología que abre las puertas a la producción masiva de embriones bovinos doble propósito, sin mayores exigencias sobre el sistema productivo mejorado, actualmente en funcionamiento.
- Se apoya sobre tecnologías ya utilizadas en nuestro entorno (como por ejemplo: la transferencia embrionaria, y el procesamiento y congelación de semen), lo cual resulta ventajoso porque se aprovecha la infraestructura ya existente, así como el personal especializado y la familiaridad del productor con la tecnología. Igualmente, la FIV puede perfectamente apoyarse en nuevas tecnologías que serán aplicadas en el futuro, como el sexaje de semen y de embriones, para imprimir un mayor valor comercial a los embriones producidos.

## GLOSARIO

- **Gameto:** Célula sexual femenina (óvulo) o masculina (espermatozoide) que unidas forman un nuevo individuo de la especie (zigoto o embrión).
- **Óvulo:** Gameto o célula sexual femenina encontrada en pequeñas vesículas o folículos a nivel de la corteza de los ovarios de las vacas y demás especies.
- **Espermatozoide:** Gameto o célula sexual masculina producida a nivel de los testículos del macho y que junto con el plasma seminal forman parte del eyaculado.
- **Capacitación Espermática:** Proceso de alteración de las membranas del espermatozoide que lo preparan para fertilizar un óvulo.
- **Heparina:** Glicosaminoglicano utilizado para inducir la capacitación del espermatozoide.
- **Fecundación:** Unión y penetración del óvulo por parte del espermatozoide para dar origen a un nuevo ser.
- **Embrión:** Ser vivo en las primeras etapas del desarrollo desde la fecundación hasta que adquiere las características morfológicas de la especie.
- **Blastocisto:** Embrión que ha formado una cavidad llena de líquido conocida como el blastocelo, la cual constituye una etapa crucial del normal desarrollo. Esta etapa es corta y transitoria que generalmente ocurre entre el día 6 y 9 en caso de las vacas.
- **Aspiración transvaginal de óvulos:** Aspiración del contenido de folículos ováricos a través de la pared de la vagina con el fin de recoger óvulos de animales vivos.

- **OPU.** Abreviatura utilizada para denominar el procedimiento anterior de aspiración transvaginal de óvulos (Ovum Pick Up). Estos óvulos pueden ser fecundados mediante FIV.
- **ICSI:** Colocación mecánica de un espermatozoide dentro del citoplasma de un óvulo (Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides, del inglés: Intracytoplasmic Sperm Injection).
- **Medio de Cultivo:** En el caso de FIV, el medio es generalmente líquido y contiene todos aquellos nutrientes (aminoácidos, proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas, buffer, y sales) que el embrión requiere para su normal desarrollo.

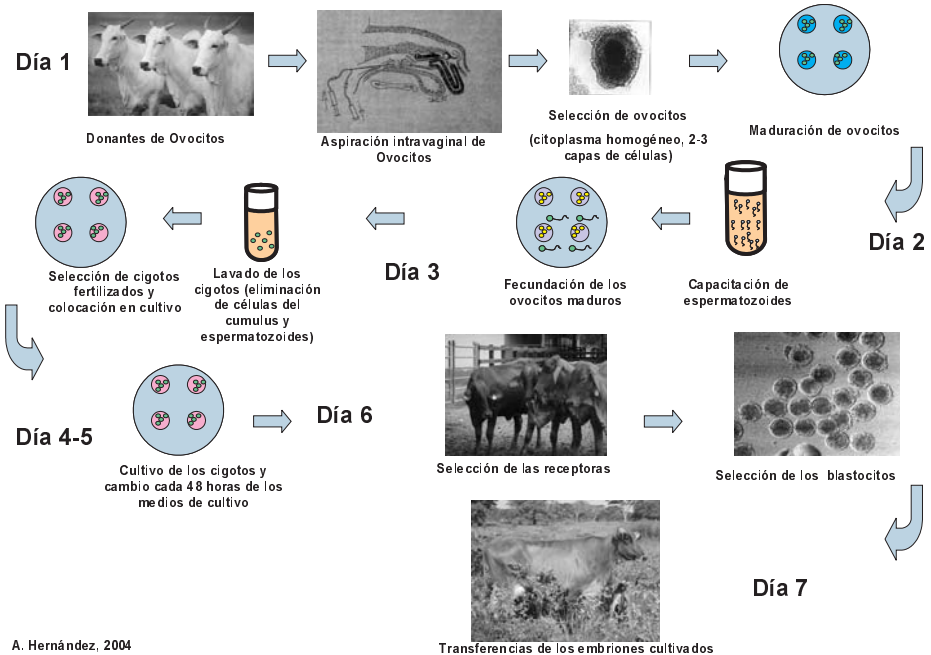
### LECTURAS RECOMENDADAS

Hernández H. Fertilización in vitro. En: Reproducción Bovina. C. González-Stagnaro (ed). Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI: 411-426. 2001.

Tanaka H, Ballarales P, Masaka J, Kanaga H. Teoría y practica de la fecundación in vitro. Agencia de Cooperación Internacional de Japon Chile, 190 pp. 1997.

Palma G. Producción in vitro de embriones bovinos. En: Biotecnología de la Reproducción. G. Palma (Ed), p 225-289. 2001.

### PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS



## **Clonado de animales mediante transferencia nuclear: aplicaciones en ganadería y biomedicina**

**Pablo Bosch, MSc, PhD**

*Department of Animal and Dairy Science,  
University of Georgia, Athens, GA 30602, USA.  
pbosch@uga.edu*

En los últimos años hemos sido testigos del surgimiento de biotecnologías que prometen revolucionar tanto el sector agropecuario, como también el de la salud humana. Una de estas biotecnologías nacida recientemente es el clonado de animales a partir de células provenientes de animales adultos. En 1997 el grupo de investigación liderado por Ian Wilmut con base en Escocia, Reino Unido, comunicó el nacimiento del primer animal (la oveja Dolly) generado a partir de una célula de un adulto mediante la técnica de transferencia nuclear (TN), noticia que conmocionó tanto a la comunidad científica como al público en general. Posteriormente, investigadores ubicados en diferentes puntos del mundo lograron clonar otras especies tales como ratones, conejos, gatos, cabras, cerdos y ganado bovino.

La palabra “clon” tiene diferentes significados de acuerdo al contexto en el cual es usada, pero en general implica múltiples copias idénticas de una molécula (Ej. ADN) u organismo unicelular o pluricelular. Por ejemplo, un grupo de microorganismos o células originadas a partir de un único antecesor, y por lo tanto idénticas entre sí, es considerado un clon. El clonado en animales pluricelulares implica la generación de individuos genéticamente idénticos mediante reproducción asexual.

Existen diferentes modalidades para generar animales clonados. Una de estas, la bipartición embrionaria, implica la separación de un embrión en dos mitades mediante una cuchilla microscópica. Cada una de ellas tiene el potencial de generar un nuevo individuo completo. Del mismo modo, cada una de las células de un embrión temprano retiene la capacidad potencial de originar un nuevo individuo. Por lo tanto, si se separan las células de un embrión temprano, cada una de ellas podría originar un individuo idéntico. Un fenómeno equivalente ocurre naturalmente en humanos y animales, en los cuales se originan hermanos genéticamente idénticos a partir de un

embrión de 2 células. Por causas desconocidas, cada célula se desarrolla independientemente de la otra para originar individuos gemelos.

Una de las desventajas de los métodos de clonación descritos anteriormente es el limitado número de clones que se pueden producir a partir de un determinado genotipo. Esta limitación puede ser superada mediante el uso de otra metodología denominada clonado mediante TN. La TN se basa en la incorporación del material genético contenido en el núcleo de una célula (por ejemplo una célula de la piel) proveniente del animal que se quiere clonar dentro de un ovocito (célula femenina) al cual se le ha removido previamente su material genético (este último proceso es conocido como enucleación).

Durante mucho tiempo la clonación de mamíferos a partir de una célula proveniente de un individuo adulto fue considerada imposible, dado que contradecía un principio biológico fundamental: células provenientes de un animal adulto no pueden ser desdiferenciadas para originar un nuevo individuo. Dicho dogma aceptado por tantos años ha perdido sustento luego de numerosas comunicaciones, documentando el nacimiento de animales clonados a partir de células adultas.

En este artículo se presentan los principios básicos de la clonación mediante transferencia nuclear, así como también las principales aplicaciones de esta biotecnología en ganadería y biomedicina.

## **CLONACIÓN POR TRANSFERENCIA NUCLEAR: ¿CÓMO SE PRODUCE UN ANIMAL CLONADO?**

El primer paso es obtener células del animal que se pretende clonar. El tejido comúnmente usado como fuente de células para clonación es la piel. De una pequeña biopsia de piel es posible obtener miles de fibroblastos los cuales se pueden multiplicar fácilmente mediante cultivo *in vitro* en el laboratorio. Mediante el uso de microinstrumentos, un fibroblasto es introducido en el interior de un ovocito que ha sido previamente enucleado (esto es, se le ha extraído todo el material genético) con una micropipeta (Figura 1, B y C). La célula y el ovocito son fusionados mediante una corriente eléctrica y luego sometidos a un estímulo físico (electricidad) o químico para activar el desarrollo embrionario (Figura 1, D).

Al fusionarse los factores presentes en el ovocito, se inducen una serie de cambios morfológicos y funcionales en la cromatina o material genético del fibroblasto a través de un fenómeno conocido como *reprogramación nuclear*. Estos cambios transforman a una célula diferenciada incapaz de producir otros tipos celulares en una con la capacidad de generar un nuevo individuo. Dado que el material genético (cromatina) del ovocito es removido durante el proceso conocido como enucleación (Figura 1, B), el material genético del fibroblasto donante del núcleo es el encargado de promover el desarrollo embrionario y fetal. Por lo tanto, todos los embriones producidos serán genéticamente idénticos al animal del cual originalmente se extrajeron las células de la piel.

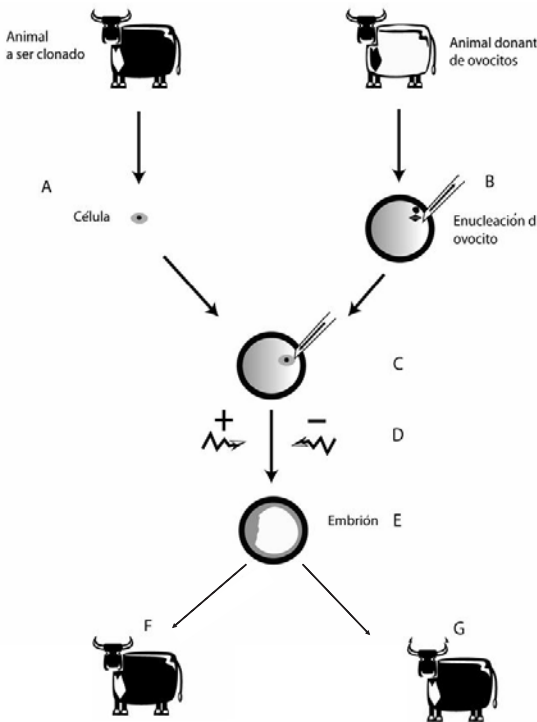
## EQUIPO UTILIZADO EN LA CLONACIÓN

Los primeros estudios sobre clonación se desarrollaron en batracios debido al considerable tamaño del ovocito en estos animales, el cual alcanza 1 mm de diámetro. Por el contrario, en mamíferos el ovocito es considerablemente más pequeño ( $\sim 0,12$  mm), por lo cual se requieren instrumentos de tamaño muy reducido para manipular tanto el ovocito receptor como la célula donante del material genético.

El equipamiento requerido para implementar la TN consta de un microscopio y un par de micromanipuladores. Estos últimos permiten el movimiento de los microinstrumentos en los 3 planos del espacio. Uno de los micromanipuladores es el encargado de sostener al ovocito en posición fija mediante succión a través de una pipeta de vidrio cuyo diámetro (aproximadamente 0,09 mm) es un poco menor que el del ovocito.

Figura 1

### Esquema de las diferentes etapas del clonado por transferencia nuclear



El primer paso es obtener células del animal que se desea clonar (A), mientras que el ovocito se puede obtener de animales vivos o de matadero. El material genético de un ovocito maduro es aspirado completamente (enucleación) mediante una pipeta de vidrio (B). Luego la célula donante del núcleo (por ejemplo un fibroblasto de la piel) se deposita dentro del ovocito utilizando una micropipeta de vidrio (C). La célula y el ovocito se fusionan mediante la aplicación de pulsos eléctricos (D). Los embriones obtenidos (E) se cultivan o se transfieren directamente a madres sustitutas (F) para originar animales clonados (G).



El otro manipulador controla el movimiento de una pipeta de transferencia que se utiliza para enuclear el ovocito y posteriormente colocar la célula dentro del ovocito. Además de estos instrumentos específicos para realizar la TN, es necesario contar con un laboratorio completamente equipado para cultivo celular.

## **EFICIENCIA DEL CLONADO POR TRANSFERENCIA NUCLEAR**

La eficiencia del clonado por transferencia nuclear es extremadamente baja. Menos del 1% de los embriones producidos por TN desarrollan hasta el término de la gestación y un alto porcentaje de los clones nacidos vivos mueren durante los primeros días de vida debido a complicaciones de origen diverso. Se cree que los problemas de desarrollo observados en animales clonados son el resultado de una incompleta y/o defectuosa reprogramación nuclear. Como consecuencia, la baja eficiencia sumada a los altos costos de equipamiento y la alta capacidad técnica asociados con la clonación, hacen que por el momento esta tecnología sea muy costosa y por lo tanto, con escasa transferencia al sector agropecuario. En la actualidad, existe un gran interés para descifrar los mecanismos biológicos involucrados en el proceso de clonado por TN y al mismo tiempo identificar condiciones apropiadas para incrementar la eficiencia de esta tecnología. De esto último, dependerá el uso extensivo del clonado en el área agropecuaria y en la salud humana.

## **APLICACIONES DEL CLONADO MEDIANTE LA TRANSFERENCIA NUCLEAR**

**Mejoramiento genético.** La identificación de animales con alto valor genético en una población con el posterior clonado de los mismos permitiría incrementar el avance genético. Sin embargo, el clonado se suma pero no suplanta otras estrategias usadas en un programa de mejoramiento genético. La situación ideal sería la combinación del clonado con la reproducción sexual. El primero se usaría para determinar el valor genético de la línea materna mediante la evaluación de la progenie (obtenida mediante clonado). La línea materna con el mérito genético más alto es luego apareada con los mejores reproductores machos disponibles. De este modo se podrían generar individuos genéticamente superiores.

**Conservación de especies silvestres en peligro de extinción.** Se prevé que en el futuro el clonado será una herramienta fundamental en programas conservacionistas tendientes a preservar especies en peligro de extinción. Adelantándose a la inminente disponibilidad de esta tecnología para preservar especies en peligro, varias organizaciones han comenzado a construir bancos genéticos con tejidos de animales salvajes en peligro de extinción conservados a bajas temperaturas. Una vez que la técnica de clonado sea perfeccionada, será posible recuperar poblaciones diezgadas e incluso recuperar especies extintas a partir de estos bancos genéticos.

**Producción de animales transgénicos.** Actualmente esta disponible la tecnología para modificar la información genética de animales mediante la incorporación de genes foráneos. El advenimiento de la técnica de clonado mediante transferencia nuclear combinada con técnicas que posibilitan la modificación genética de células en cultivo ha abierto nuevas oportunidades para la producción de animales genética-

mente modificados. Por ejemplo, hoy es posible incorporar (o eliminar) un determinado gen en células en cultivo. Posteriormente, estas células transgénicas se utilizarán como donantes de núcleos para producir animales clonados los cuales poseerán la alteración genética deseada.

## APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA TRANSGÉNICA

**Producción de fármacos.** Los genes que codifican proteínas humanas pueden ser intercalados en el genoma de células en cultivo. Animales producidos por TN, a partir de estas células expresarán la proteína humana la cual es liberada a través de la leche, la orina o la sangre. Estas proteínas producidas en grandes cantidades y a bajo costo por animales transgénicos serán utilizadas para el tratamiento de enfermedades del hombre. Ejemplos de proteínas de uso terapéutico humano producidas por animales transgénicos incluyen la alfa-lantitripsina para el tratamiento de la fibrosis quística y el factor de coagulación IX para el tratamiento de la hemofilia.

**Producción de órganos de cerdos para el trasplante humano (xenotransplante).** Durante mucho tiempo ha existido una gran brecha entre la enorme demanda y la baja disponibilidad de órganos para trasplante. Por ello, existe gran interés en el desarrollo de métodos que permitan el uso de tejidos y órganos de cerdos para el trasplante humano. Si bien los órganos de cerdo se asemejan a los humanos en cuanto a tamaño y fisiología, existe el problema del rechazo inmunológico de los mismos. Ciertas proteínas en la superficie de las células de cerdo son responsables del rechazo por parte del sistema inmune humano. Varios laboratorios ya han comunicado el nacimiento de cerdos transgénicos que no expresan dichas proteínas; por lo tanto, las células de dichos animales serían mejor toleradas por el receptor humano. Estos avances constituyen un paso importante hacia la futura aplicación de esta tecnología.

**Producción de animales resistentes a enfermedades.** Mediante la adición o substracción de determinados genes sería posible generar líneas de animales resistentes a ciertas enfermedades. Por ejemplo, la eliminación de un gen conocido como PrP podría generar animales resistentes a la encefalopatía espongiforme de los bovinos.

## PRODUCCIÓN DE CÉLULAS MADRE (STEM) CON FINES TERAPÉUTICOS

Las células madre o stem se pueden definir como células provenientes de un embrión temprano que poseen la capacidad de proliferar *in vitro* indefinidamente y generar múltiples tipos celulares (Ejm. células del hueso, nerviosas, musculares, etc.). Existen grandes expectativas de que estas células peculiares tendrán un gran impacto en el tratamiento de un sinnúmero de enfermedades humanas, tal es el caso de los padecimientos degenerativos del sistema nervioso como la enfermedad de Parkinson. En el futuro, células diferenciadas provenientes del individuo enfermo (Ejm. células de la piel) se usarían como donantes de núcleos para producir embriones (clones) a partir de los cuales se aislarían células madre. Mediante tratamientos inductores específicos estas células madre pueden originar, por ejemplo, neuronas las cuales se usarían para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso del paciente. Recientemente, un grupo de investigación surcoreano ha logrado producir una línea

de células madre a partir de un embrión humano clonado representando una prueba sustancial de la futura aplicabilidad de esta metodología en humanos. Dado que el objetivo del clonado en las circunstancias descritas precedentemente es el tratamiento de enfermedades, esta modalidad se denomina *clonado con fines terapéuticos*. La otra modalidad es el denominado *clonado con fines reproductivos*. Como su nombre lo indica, su objetivo es obtener uno o varios individuos genéticamente idénticos a la persona donante de la célula. Si bien existen grupos minoritarios que se expresan a favor del clonado reproductivo, hay una serie de cuestionamientos éticos que al igual que las limitaciones técnicas desalientan la clonación en humanos con este fin.

En conclusión, el clonado a partir de un animal adulto, algo inimaginable pocos años atrás, es hoy una realidad. Sin embargo, la eficiencia de esta tecnología es extremadamente baja lo que ha limitado su aplicación en la industria agropecuaria, como así también en la salud humana. Es de esperar que en los próximos años presenciemos una mejora sustancial de la eficiencia del clonado mediante la TN, lo que traerá aparejada la expansión de su uso para el mejoramiento genético. Seguramente en un futuro cercano veremos como se ponen en práctica muchas de las aplicaciones en las cuales la tecnología de la clonación promete jugar un papel preponderante.

## **LECTURAS RECOMENDADAS**

- Bosch P, Hodges CA, Stice SL. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biotechnología Aplicada* 21(3):128-136. 2004.
- Campbell KHS. Nuclear transfer in farm species. *Cell and Developmental Biology* 10:245-252. 1999.
- Campbell KHS. A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J. Anat.* 200:267-275. 2000.
- Campbell KHS, Alberio R, Lee J, Ritchie WA. Nuclear transfer in practice. *Cloning and Stem Cells* 3:201-208. 2001.

## Determinación y preselección del sexo en ganadería bovina

**Andrés Kowalski Larreal, Ing. Agr, MSc, PhD**

*Decanato de Agronomía, Departamento de Producción Animal,  
Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado,  
Barquisimeto-Venezuela. andresk@ucla.edu.ve*

La determinación del sexo de un individuo esta dada por la combinación de los cromosomas sexuales en el genoma del animal. Para el caso de los bovinos, al igual que en el humano la presencia del cromosoma X y del cromosoma Y en el genoma del individuo determina el desarrollo de un animal macho, y la presencia de dos cromosomas X determina el desarrollo de un animal hembra. Esto se debe principalmente a la presencia de ciertos genes en el cromosoma Y, tales como el gen SRY que codifica proteínas que inhiben la producción de un esteroide llamado estrógeno en las células primordiales del embrión, durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario. Esta proteína SRY bloquea la producción de la enzima encargada de producir estrógeno (aromatasa). Esta condición favorece al desarrollo de un embrión macho. En el caso de que el cromosoma Y no esté presente en el genoma, no se producirá la proteína SRY lo cual permitirá la producción normal de estrógeno y por ende el desarrollo de un embrión hembra.

La capacidad de identificar o preseleccionar el sexo en animales domésticos siempre ha generado inquietud en los productores de animales domésticos, especialmente aquellos relacionados con la producción de leche y carne y en forma muy especial, si la determinación pudiera realizarse antes de que se produzca la gestación del animal, y aun mucho más si fuera posible, inclinar la balanza hacia uno de los dos sexos. De esta manera, los productores de leche tratarían de obtener mayor proporción de hembras, mientras que los productores de carne tratarían de obtener mayor número de machos.

Durante mucho tiempo han existido creencias las cuales se han idealizado para aplicar tratamientos o fórmulas para tratar de controlar la selección del sexo, muchos de estos tratamientos empíricos se basan en el uso de alimentos específicos, en el estadio de la fase lunar, etc.; sin embargo, ninguna de estas creencias ha tenido éxito.

## **DETERMINACIÓN DEL SEXO DE LOS EMBRIONES**

Una de las alternativas utilizadas hoy en día es la determinación del sexo de los embriones después que ha ocurrido la fertilización. Diferentes metodologías se han aplicado para la separación de los embriones machos de las hembras. Uno de los ensayos es a través de procesos inmunológicos, en el cual se utilizan anticuerpos diseñados que son específicos contra moléculas que se encuentran en la superficie del embrión macho. También a través de enzimas que normalmente son producidas por los embriones hembras; de igual manera, se puede determinar el sexo de los embriones analizando cariotipos de biopsias realizadas en los embriones, en los cuales se observa la presencia o no del cromosoma Y.

El avance de tecnologías de biología molecular en estos últimos años ha permitido la incorporación de tecnologías con hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcadora que identifica en una célula del embrión la presencia o no del cromosoma Y. A partir de mediados de la década de los noventa se introdujo una técnica que permite la amplificación de regiones del ADN en forma muy específica, la cual ha sido denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta tecnología funciona en forma muy similar a una copiadora en la cual una región específica del ADN, en este caso una parte del cromosoma Y es copiada millones de veces. Esto permite poder determinar el sexo de los embriones con pequeñas muestras y con una sencilla célula del embrión. Esta biopsia del embrión se realiza aproximadamente cuando tiene 2 ó 3 días de desarrollo. En este periodo, los embriones pueden tener entre 8 y 16 células. La utilización de micromanipuladores permite remover una célula del embrión denominada blastómero, y se procede a la amplificación utilizando PCR de la región que se encuentra en el cromosoma Y como es el gen SRY.

Esta técnica, a diferencia de las anteriormente usadas en la determinación del sexo, es muy precisa y sensible. Esta metodología puede realizarse en un periodo de 2 a 3 horas, con lo que se garantiza que el embrión al cual se le esta determinando el sexo pueda continuar su desarrollo normalmente. Esta tecnología se usa actualmente en Venezuela y su efectividad esta por encima del 95%. Algunas de las limitantes de esta técnica es que el número de embriones sexado es limitado y que el procedimiento es costoso.

## **SELECCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES PORTADORES DE LOS CROMOSOMAS X O Y**

La separación de los espermatozoides que contienen el cromosoma X o Y se basa en la diferencia que tienen en su contenido de ADN. Es conocido que el cromosoma Y es de menor tamaño que el cromosoma X y esta variación origina diferencias en el tamaño y forma de los espermatozoides, peso, densidad, motilidad, cargas eléctricas y la presencia de antígenos superficiales. Diferentes criterios han sido utilizados para la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X o Y. Uno de estos criterios se basa en su densidad. El espermatozoide que porta el cromosoma X es entre 2,9 a 4,2% más grande que el que porta el cromosoma Y, y por ende las densidades de los espermatozoides son diferentes. Se han utilizado medios con diferentes gradientes de densidades para separar los espermatozoides. También se han realizado separaciones basadas en la carga eléctrica de los espermatozoides que portan el cromosoma X o Y. Se

demonstró que los espermatozoides que portan el cromosoma X migran más rápido en dirección al cátodo, por lo cual se han utilizado campos eléctricos para su separación.

A través de procedimientos inmunológicos se han separado los espermatozoides, específicamente mediante la utilización de anticuerpos en contra del antígeno H-Y que esta presente en los espermatozoides portadores del cromosoma Y. Aunque todas estas técnicas están basadas en criterios lógicos, ellas no han producido resultados aceptables en la preselección de los espermatozoides. Sin embargo, las diferencias en el contenido de ADN entre los espermatozoides que portan el cromosoma X o Y han permitido el uso de tecnologías como la citometría de flujo. Esta técnica se basa en analizar la cantidad de luz emitida por cada espermatozoide cuando es impactada por luz ultravioleta proveniente de un rayo láser. Se ha determinado que la fluorescencia de los espermatozoides que portan el cromosoma X es mayor que aquellos que portan el cromosoma Y y esta diferencia es detectada por el equipo de citometría de flujo, la cual separa los espermatozoides. Este equipo no solo separa los espermatozoides en base al contenido de sus cromosomas, sino que también separa aquellos espermatozoides que han muerto. De esa manera, se generan 3 poblaciones de espermatozoides: los X, los Y y los muertos. Una de las limitaciones de esta tecnología es el poco número de espermatozoides sexados. El máximo número de espermatozoides sexado por hora no es mayor que 4 millones de espermatozoide en cada fracción (X o Y), lo que implica que producir pajuelas de semen sexado para inseminación artificial es muy costoso. Sin embargo, esta cantidad de espermatozoides sexados por el sistema de citometría de flujo son suficientes para ser utilizados en fertilización *in vitro* y de esta manera poder lograr un número considerable de embriones de sexo predeterminado a un costo razonable.

Esperamos que esta tecnología este a disposición del ganadero venezolano en un corto plazo de tiempo ya que existen actualmente instalaciones en las universidades de Venezuela que tienen la capacidad para realizar fertilizaciones *in vitro* y sólo están a la espera de la adquisición de los equipos de citometría de flujo.

## **APLICACIÓN DE ULTRASONOGRAFÍA EN LA DETERMINACIÓN DEL SEXO**

La aplicación de la ultrasonografía transrectal en el estudio de la reproducción bovina ha representado un salto tecnológico que ha revolucionado la biología reproductiva. Las imágenes obtenidas del ultrasonido han facilitado el estudio del complejo proceso reproductivo en bovinos. En la hembra se incluyen estudios de la dinámica folicular, funcionamiento del cuerpo lúteo, manejo reproductivo posparto, diagnóstico precoz de gestación, desarrollo fetal y de las patologías reproductivas. En el macho se evalúan condiciones normales o patológicas de las glándulas sexuales accesorias, del cordón espermático, epidídimo y de los testículos.

La aplicación de la ultrasonografía en las especies bovina y equina corresponde a los años 80; sin embargo, su desarrollo y perfeccionamiento para el estudio de los eventos reproductivos se ha acelerado en la presente década. En la actualidad, la ultrasonografía es usada como una tecnología secundaria en la práctica reproductiva bovina. No obstante, la capacidad de recolectar información del ultrasonido es superior a la de la palpación rectal.

La evaluación temprana de la preñez y de la viabilidad fetal con el uso del ultrasonido, permite identificar las vacas que no se preñaron. De esta manera, se logra mejorar la eficiencia reproductiva al reducir el intervalo entre servicios y los días vacíos, a la vez que incrementa la tasa de servicios. Esta técnica también nos permite la identificación temprana de gestaciones gemelares; así mismo, las patologías uterinas y ováricas que no son detectadas con precisión en la palpación rectal, pueden ser visualizadas con el ultrasonido y de esta manera facilitar la aplicación de una terapia adecuada.

El ultrasonido se ha usado ampliamente en el desarrollo de programas de cruzamiento controlado en bovinos, entre las que se mencionan la sincronización de celo y ovulación. Otras aplicaciones más especializadas incluyen la aspiración folicular de ovocitos (ovum pick-up) y la ablación folicular.

El fundamento de la ultrasonografía se basa en el empleo de ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de los tejidos blandos y de los órganos internos, las cuales se pueden visualizar a través del ecógrafo. Es una técnica de diagnóstico por imagen sobre la base de emisión de ultrasonidos y la recepción de ecos. Estos ecos se producen por la reflexión de los ultrasonidos a nivel de los distintos tejidos. En el formato de imagen llamado modo B, estos ecos van a ser presentados como puntos de brillos. Los órganos o tejidos serán hiper, hipo o anaecogénicos, según la cantidad de ultrasonido que reflejen. No obstante, en la imagen aparecen puntos de brillo que no se corresponden con ecos producidos a nivel de estructuras reales del paciente. Estos son denominados artefactos, y es importante conocerlos y diferenciarlos de los ecos reales para poder interpretar correctamente las imágenes.

El mayor impacto de la ultrasonografía en la práctica veterinaria bovina ha sido el de superar a la técnica de palpación rectal, puesto que permite mejorar la precocidad y la eficiencia del diagnóstico de preñez temprana o la palpación ovárica a través del recto. Con el ultrasonido en tiempo real se han reportado gestaciones en ganado de hasta de 12 días; no obstante, la precisión del diagnóstico es variable. En estudios realizados en novillas de leche entre 16 y 18 días de preñez, la precisión fue menor del 50% y se obtuvieron mejores resultados entre los 20-22 días donde se alcanzaron resultados de hasta un 100%.

La ventaja del uso de la ultrasonografía en el diagnóstico temprano de la preñez se apoya en que es capaz de detectar la viabilidad del embrión a través de su latido cardíaco. Con el diagnóstico temprano de la preñez, se disminuyen los costos de mantenimiento de vacas no gestantes; y en el caso de la transferencia de embriones, el mantenimiento de la vacas receptoras. La manipulación directa del tracto reproductivo es innecesaria con esta técnica. De esta manera se reduce el riesgo de causar pérdidas embrionarias, las cuales ocurren con frecuencia en rebaños bovinos por causas virales, bacterianas, micóticas, protozoos y a menudo por causas iatrogénicas en el desarrollo de la palpación rectal.

Se han realizado estudios en bovinos que revelan que la mortalidad embrionaria ocurre con mayor frecuencia entre los 25 y 45 días de gestación (7%) y entre 45 y 65 días (2%). No obstante, a pesar de la confiabilidad de la técnica de palpación rectal, algunos autores recomiendan hacer una revisión ginecológica entre los 60 y 90 días de gestación.



La ultrasonografía también es usada para el sexaje del feto bovino. Después del día 50 de gestación, los fetos hembras y machos pueden ser diferenciados por la localización relativa del tubérculo genital (presumible pene o clítoris) y el desarrollo de una masa dentro del escroto en el feto macho. El procedimiento del sexaje por ultrasonido es confiable (Cuadro 1). La precisión del sexaje puede ser optimizada cuando se realiza en el tiempo apropiado. La determinación del sexo antes del día 60 es más difícil porque el desplazamiento relativo del tubérculo genital es incompleto. De igual manera, cuando se realiza la técnica después del día 85 de gestación puede disminuir la precisión, debido a que el feto se hace de mayor tamaño, dificultando el movimiento del transductor para obtener la imagen adecuada. Cuando avanza la gestación, el cuerno uterino gestante desciende hacia la cavidad abdominal, lo cual dificulta el sexaje sin la retracción del cuerno. Esta retracción y manipulación del cuerno gestante incrementa los riesgos de pérdida del feto. Al evaluar estas situaciones se sugiere realizar el sexaje por ultrasonido del feto bovino entre los días 60 y 85 de gestación.

El principal objetivo de la determinación del sexo de fetos en hembras bovinas gestantes es para la comercialización, ya que una hembra bovina a la que se le conoce el sexo de su feto se le incrementara el valor a nivel de mercado.

### Cuadro 1

#### Precisión de la Predicción por Ultrasonido del sexo fetal bovino entre 59 y 78 días de gestación usando un transductor de 7,5 M Hz o de 5 MHz

	Predicción del sexo	
	Macho	Hembra
Nº de predicciones	170	164
Nº de confirmaciones	169	160
Porcentaje de confirmación	99%	98%

La ultrasonografía tiene el potencial de mejorar los métodos usados en la práctica veterinaria convencional y en la transferencia de embriones. Una de las aplicaciones más importantes es para mejorar y ampliar la capacidad de la palpación rectal. La determinación del sexo del feto en hembras bovinas gestantes a través de la ultrasonografía se convertiría en una herramienta valiosa para el establecimiento de la ganadería de doble propósito en el ámbito nacional. No obstante, el uso de la ultrasonografía en la actualidad está algo limitada debido al costo del equipo.

## LECTURAS RECOMENDADAS

Garner DL, Seidel GE Jr. Sexing bull sperm. In: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Document No. A5005.0600. 2004.

Perea F, Cruz R. Usos de la ultrasonografía en la evaluación reproductiva de la vaca. En: *Reproducción Bovina*. C. González-Stagnaro (ed). Cap. XXIII: 357-372. 2001.

Seidel GE Jr. Sexed sperm and sexed embryos – Where are we and where are we going, and when. In: *Proceedings 18<sup>th</sup> Ann Convention American Embryo Transfer Association.*, p 47-59. 1999.



## ¿Es posible predecir la fertilidad en los toros?

**Ninoska Madrid-Bury, MV, MSc, DMV**

*Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia.  
Maracaibo-Venezuela ~ ninoskamdrid@yahoo.es*

Uno de los principales problemas en la producción del semen bovino radica en el conocimiento de la fertilidad o capacidad fecundante de cada toro. De una cuidadosa valoración de la fertilidad, dependerá la utilización futura del material seminal y el grado de aprovechamiento de los eyaculados obtenidos durante su vida reproductiva, es decir, las dosis producidas por eyaculado en función del número de espermatozoides viables.

Cuando se realiza un espermiograma del semen fresco, se evalúa en forma rutinaria la concentración, motilidad y morfología; una vez congelado, se determina la concentración y la motilidad. La motilidad, es el parámetro más utilizado para valorar la viabilidad de una muestra seminal. Sin embargo, ni el espermiograma ni la evaluación que se hace de rutina al semen descongelado en los centros de toros o de inseminación artificial han mostrado ser suficientes para determinar el nivel potencial de fertilidad de una muestra de semen.

En las últimas décadas se han diseñado una serie de técnicas *in vitro* que buscan predecir en forma confiable la fertilidad de los toros utilizados en IA, pero los inconsistentes resultados han mostrado que lo máximo logrado es una estimación de la fertilidad. El hecho que aún no haya sido posible diseñar un método de valoración *in vitro* de las muestras de semen utilizadas se atribuye a que la fertilidad del macho es una característica muy compleja y de naturaleza multifactorial. Es imprescindible que los espermatozoides congelados y descongelados conserven la motilidad, la integridad de sus membranas y su habilidad para capacitarse y desarrollar la reacción acrosómica para que resulten aptos para unirse y penetrar la zona pelúcida, alcanzar el citoplasma del ovocito y formar el pronúcleo masculino, y ello no siempre es fácil de lograr en todos los casos.

Este trabajo presenta y describe algunos de los métodos más utilizados *in vitro* para determinar la capacidad fecundante de los espermatozoides y su relación con la fertilidad *in vivo* del semen congelado de toros.

## PRUEBAS DE RUTINA DE VALORACIÓN DEL SEMEN

**Motilidad.** La motilidad progresiva de los espermatozoides ha sido utilizada ampliamente para predecir la fertilidad de una muestra de semen; sin embargo, los resultados obtenidos en relación con la fertilidad son contradictorios. Se han señalado correlaciones entre motilidad y fertilidad a campo de los machos, que van desde  $r=0,15$  hasta  $r=0,83$ , sin embargo, estos hallazgos no siempre han podido ser corroborados. La evaluación subjetiva con microscopio de contraste de fases es la práctica más común para determinar la motilidad.

En las últimas décadas, la utilización de los equipos CASA (Computer Assisted Sperm Analyser) es una práctica que cada vez se hace más habitual para evaluar en forma objetiva la motilidad espermática. Se ha reportado la relación entre ciertos patrones del movimiento espermático, especialmente movimiento lineal, con la fertilidad *in vivo*. Sin embargo, es importante resaltar que al determinar la motilidad, no se toma en consideración, la habilidad de las células espermáticas para desarrollar ciertos procesos importantes para la fertilización *in vivo*, como son la capacitación, la reacción del acrosoma y la fertilización.

**Concentración Espermática.** La fertilidad de una muestra de semen dependerá del número de espermatozoides con atributos normales que posea. La fertilidad de los machos bovinos describe una curva de dosis-respuesta en relación al número total de espermatozoides normales inseminados y ese comportamiento es individual para cada toro. Al inicio, la curva muestra un desplazamiento casi vertical, para luego llegar a una meseta, conocida como fertilidad individual máxima. Eso significa, que si se aumenta el número de espermatozoides por dosis por encima del número presente al inicio de la meseta de la curva de fertilidad de un determinado toro, no necesariamente se incrementará en forma significativa la fertilidad de ese animal.

Cuando se realiza la evaluación de rutina del semen descongelado, se considera aceptable para inseminar, una motilidad espermática entre 40 y 50%. Sin embargo, esta motilidad no es un reflejo del número mínimo de espermatozoides necesarios para que el toro tenga una fertilidad aceptable, en especial, si se tiene en consideración que con el proceso de la congelación más del 30% de las células espermáticas sufrirán lesiones irreversibles.

**Morfología.** Con esta prueba se valora la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y se determina su relación con la fertilidad *in vivo* de los toros. Es utilizada para eliminar toros con pobre calidad seminal y refleja la funcionalidad de los testículos, epidídimos y de las glándulas accesorias. Se han mostrado correlaciones negativas entre los espermatozoides anormales con la viabilidad y con la fertilidad, sin embargo, su utilidad está limitada cuando se evalúan toros en centros de IA que poseen alta fertilidad, ya que las muestras de semen tienen aceptables porcentajes de espermatozoides normales. Generalmente, la morfología no se correlaciona con la fertilidad del toro, a no ser que exista un alto porcentaje de espermatozoides con formas anormales en la muestra.

## PRUEBAS COMPLEMENTARIAS DE FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

En las últimas décadas, al espermiograma convencional se le han adicionado otras pruebas *in vitro* que valoran la funcionalidad de la célula espermática. Con esas pruebas se trata de determinar la mayor cantidad de atributos de los espermatozoides que son relevantes para la fertilización y para el desarrollo embrionario. La valoración de varios de estos parámetros y su estudio en conjunto, podría conducir a una mejor interpretación de la capacidad fecundante de los espermatozoides, ya que como se ha indicado, la fertilización es un proceso en el que intervienen un gran número de factores o atributos y la valoración de uno solo de ellos, no es suficiente para determinar la fertilidad de una muestra de semen.

**Integridad de la Membrana Plasmática.** Este test se realiza bajo la presunción de que solo los espermatozoides viables mantienen sus membranas intactas, siendo capaces de interactuar con el oviducto y el ovocito para transportarse, capacitarse y fertilizar. Por otro lado, esta prueba provee información acerca del grado de preservación del semen después de haber sido congelado y descongelado.

La integridad de la membrana se puede determinar a través del test de endósmosis (HOS-T), el cual comprueba la capacidad de la membrana plasmática de la célula espermática de hincharse sin romperse, cuando es expuesta a soluciones salinas hipotónicas. También es posible valorar la integridad de la membrana, a través de tinciones fluorescentes utilizadas solas o en combinación con otros fluorocromos específicos para el ADN; sin embargo, es contradictorio el valor del examen de la integridad de la membrana plasmática para determinar la fertilidad de los toros. Se han señalado correlaciones con la fertilidad *in vitro* e *in vivo* de los machos, aunque cuando las evaluaciones se hicieron mediante fluocitometría o fluorescencia, no se observaron correlaciones con la fertilidad *in vivo*.

**Reacción del Acrosoma.** La reacción del acrosoma es inducida por la zona pelúcida en el momento en que el espermatozoide entra en contacto con el ovocito. Puede ser inducida *in vitro*, a través de la exposición de los espermatozoides a sustancias como los glicosaminoglicanos (GAGs), de las cuales el más potente es la heparina. Otros GAGs importantes serían el ionóforo de calcio A23187 o el condroitin sulfato.

La habilidad de los espermatozoides de bovino para capacitarse en respuesta a los GAGs y de realizar a continuación la reacción del acrosoma ha sido relacionada con la fertilidad. También se ha indicado, que la inducción de la reacción acrosómica con el ionóforo de calcio A23187 estuvo correlacionada con la fertilidad *in vivo* de los toros, medida por la tasa de no retorno. Por otro lado, se ha señalado que es posible jerarquizar la fertilidad relativa de los toros lecheros, a través del test de la reacción acrosómica en espermatozoides incubados en condroitin sulfato.

**Fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario (FIV).** La fecundación *in vitro* (FIV) ha sido utilizada como un método complementario para investigar la fertilidad de los toros en condiciones controladas *in vitro*. La importancia de la FIV estaría basada en el hecho de que se han señalado correlaciones positivas entre la fertilidad *in vivo* de los toros con la penetración de ovocitos, la división de embriones y con la formación de blastocistos *in vitro*; sin embargo, en algunos casos no se han confirmado.

La prueba de la penetración *in vitro* refleja varias características del espermatozoide como viabilidad, motilidad, morfología, capacitación y la reacción del acrosoma, valorando la capacidad de los espermatozoides para penetrar y fertilizar ovocitos *in vitro*. En toros se han señalado correlaciones entre la penetración de ovocitos *in vitro* y la fertilidad a campo determinada por la tasa de no retorno.

De igual manera, se han indicado correlaciones positivas significativas entre la división de embriones y la tasa de no retorno, así como entre la división de embriones y los blastocistos obtenidos *in vitro*. Las correlaciones entre el no retorno y los blastocistos producidos *in vitro* son bajas o no se presentan, posiblemente debido a que la formación de blastocistos es más dependiente de las condiciones del cultivo en las que se encuentre el embrión.

**Integridad de la cromatina espermática.** Los daños en el ADN pueden tener un impacto negativo en el desarrollo embrionario y en la vida futura de la cría. Los daños en la cromatina de los espermatozoides puede no ser observada cuando se valoran las características seminales *in vitro*, lo que significa, que una población de espermatozoides puede parecer normal en el laboratorio y sin embargo, su cromatina puede estar dañada. Se han señalado correlaciones entre la estructura de la cromatina espermática determinada por fluocitometría y la fertilidad de los toros.

Existen varios métodos para determinar el grado de condensación y de estabilidad de la cromatina del espermatozoide. La condensación puede ser evaluada con tintaciones de toluidina o azul de anilina y mediante marcadores fluorescentes (naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) utilizando el microscopio de fluorescencia ó mediante fluocitometría. La estabilidad puede ser evaluada a través del tratamiento de los espermatozoides con diferentes quelatos como el ácido etilén-diamino tetraacético (EDTA), con agentes reductores de puentes disulfuro como el ditiotreitól (DTT) o con detergentes aniónicos como el dodecil sulfato sódico, el cual rompe las uniones no covalentes.

**Indicadores moleculares de fertilidad.** Una gran variedad de proteínas que han sido propuestas como indicadores de la fertilidad en los machos pero al igual que los ensayos para determinar los atributos de los espermatozoides, no es muy probable que los ensayos moleculares, realizados en forma individual, puedan detectar sub-fertilidad en todas las muestras de semen. No obstante, el análisis múltiple de indicadores moleculares podría ser de más valor.

Informaciones recientes han sugerido que las proteínas del plasma seminal tienen algún efecto sobre la fertilidad. El plasma seminal de los toros de alta fertilidad mejoró en forma marginal la tasa de penetración *in vitro* de los espermatozoides de los toros de baja fertilidad, mientras que, a la inversa, el plasma seminal de los toros de baja fertilidad provocó un descenso en la tasa de penetración de los espermatozoides de los toros con alta fertilidad. Otras investigaciones señalan una alta correlación ( $r=0,89$ ) entre la presencia de algunas proteínas en el plasma seminal y la fertilidad *in vivo* de los toros.

Las proteínas que se unen a la heparina son ejemplos de proteínas de las glándulas accesorias que pueden influenciar la fertilidad. En la superficie de los espermatozoides eyaculados, las proteínas que se unen a la heparina son abundantes, sin embargo, estas proteínas son escasas en la membrana plasmática de los espermatozoi-

des epididímales. La cantidad de Antígeno Asociado a la Fertilización (FAA) en el espermatozoide está asociada con la fertilidad. Al inseminar vacas y novillas con espermatozoides positivos y negativos a FAA, la fertilidad fue alrededor del 15% superior en vacas inseminadas con espermatozoides positivos al FAA. En experimentos en los que se utilizó la monta natural, la fertilidad de los toros positivos al FAA fue 9% más alta que la de los toros negativos.

En conclusión, la evaluación *in vitro* de la calidad espermática es importante en la selección de reproductores, a la vez que ofrece información acerca del grado de preservación del semen durante el proceso de congelación. El espermatozoide es una célula que posee muchos atributos importantes para la fertilización, los cuales no pueden ser valorados realizando una sola prueba. Debe aceptarse el hecho, de que hasta el momento, no existe ninguna prueba de laboratorio, que por si sola pueda en forma confiable predecir la fertilidad del semen de un determinado macho. La tendencia moderna está dirigida a realizar estudios de regresión múltiple, en los que se combinen los resultados de las pruebas convencionales de evaluación seminal y los de las pruebas de funcionalidad, entre las que se incluyen la fecundación *in vitro*, la integridad de la cromatina o la reacción del acrosoma. La posibilidad de predecir la fertilidad de los machos incrementará, en la medida que a una muestra de semen se le realicen la mayor cantidad de pruebas que valoren los atributos de los espermatozoides para favorecer la fertilización y el desarrollo embrionario.

## LECTURAS RECOMENDADAS

Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J Androl* 10: 89-98. 1989.

Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still Utopia? *Reprod Dom Anim* 38: 312-318. 2003.

Rota A, Penzo N, Vincenti L, Mantovani, R. Hypoosmotic swelling (HOST) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53: 1415-1420. 2000.

Schneider CS, Ellington JE, Wright RW Jr. Relationship between bull field fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. *Theriogenology* 51: 1085-1098. 1999.

Ward F, Enright BP; Rizos D, Boland M, Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gametes co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57: 2105-2117. 2002.

Ward F, Rizos D, Boland MP, Lonergan P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 59: 1575-1584. 2003.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. En; *Physiology of Reproduction*. 2<sup>nd</sup> edition. Knobil, E; Neill, JD (eds). New York, Raven Press. Pp. 189-317.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Inter J Androl* 21: 207-216.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Haard MGH, Rodríguez-Martínez H. 1999. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessment of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-program. *Int J Androl* 22: 253-260.