

Biotechnologías de la reproducción: lecciones desde los ovinos.

A. Menchaca, PC. dos Santos-Neto, F. Cuadro, M. Souza-Neves.

Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

En general los machos de la mayoría de las especies de producción tienen una ventaja sobre las hembras para la propagación de sus genes. Cada macho luego de la pubertad, puede renovar constantemente su población de gametos y producir espermatozoides prácticamente durante toda la vida y de forma casi ilimitada. Por este motivo cada macho puede producir –sin nuestra intervención– decenas de crías cada año. Por el contrario, las hembras mamíferos nacen con toda la población de ovocitos en sus ovarios y casi todos ellos desaparecerán a lo largo de la vida sin generar descendencia. Si consideramos que una hembra ovina posee aproximadamente unos 300.000 ovocitos al nacimiento, y que normalmente no va a producir más de 5 a 10 crías en toda su vida, la pregunta que surge es ¿qué ocurre con el resto de los gametos? o mejor aún ¿qué podemos hacer para aprovechar el potencial reproductivo de esta hembra?

Las biotecnologías de la reproducción han sido desarrolladas como herramientas para maximizar el potencial reproductivo de aquellos animales que pretendemos multiplicar, o incluso para generar nuevos animales mejorados o con características nuevas que no existían en esa especie. Estas tecnologías aplicadas al control de la reproducción en ovejas abarcan desde la sincronización estral e inseminación artificial hasta la producción de animales por ingeniería genética. Han hecho una contribución fundamental a la mejora genética de la mayoría de las especies domésticas, así como más recientemente han hecho posible la generación de animales clonados, transgénicos y de edición génica. Los

principales avances en los últimos años han surgido del mayor conocimiento de los aspectos básicos de la fisiología reproductiva y del desarrollo embrionario para generar tecnologías aplicables en diferentes ámbitos. Presentamos de manera esquemática las principales novedades que se han reportado en los últimos años, con énfasis en los resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

CONTROL DE LA DINAMICA FOLICULAR PARA IATF.

Desde hace algunos años está claramente establecido que existen ondas foliculares en las ovejas, cabras y vacas. Los folículos antrales mayores a 2 o 3 mm de diámetro muestran un patrón de crecimiento en forma de ondas determinado por el sistema endócrino mediante la acción de hormonas gonadotróficas y esteroideas. Si bien existe cierta variación en el número de ondas por ciclo estral, en las ovejas lo más frecuente es que ocurran 3 o 4 ondas foliculares. Las ondas foliculares en rumiantes también han sido descritas durante la etapa prepuberal, el anestro y la gestación temprana (revisado en ovejas por Evans, 2003; en cabras por Rubianes & Menchaca, 2003; en vacas por Adams et al., 2008). Algunos de las características más frecuentemente observadas en las ovejas son: 1) en cada onda se observa por lo menos un folículo que alcanza un diámetro ≥ 5 mm; 2) el folículo más grande de cada onda crece durante 5-7 días aproximadamente, con una tasa de crecimiento cercana a 1 mm/día; 3) el diámetro máximo alcanzado por el folículo mayor de una onda difiere entre las ondas; 4) a medida que avanza la fase luteal y las concentraciones de progesterona aumentan,

el diámetro máximo alcanzado por el folículo más grande es menor, el recambio folicular se ve favorecido y los intervalos entre ondas son más cortos que durante la fase luteal temprana; 5) durante la fase luteal media-tardía se ha propuesto que los folículos que no crecen más allá de 4 mm no serían parte del fenómeno de ondas sugiriendo que representan un pool dinámico basal; 6) en la mayoría de los casos los folículos que finalmente ovulan son aquellos que presentaban el mayor diámetro al día en que ocurrió la luteolisis; 7) cuando ocurren ovulaciones dobles los folículos ovulatorios en la mayoría de los casos provienen de la misma onda folicular aunque también pueden ser parte de ondas diferentes; y 8) las ovulaciones dobles ocurren dentro un rango de tiempo generalmente menor a las 12 horas. Estos y otros aspectos han sido revisados en mayor profundidad por Menchaca & Rubianes (2004).

Las ondas foliculares -y en particular el reclutamiento y la dominancia folicular- tienen un efecto marcado sobre la respuesta de la hembra a los tratamientos de sincronización estral y a la superovulación, así como afectan la producción de embriones tanto *in vivo* como *in vitro*. Por este motivo, a partir de la mejor comprensión de la dinámica folicular se diseñaron nuevos protocolos que permiten sincronizar mejor la ovulación y lograr tasas de preñez aceptables con una única inseminación sin detectar el estro (inseminación artificial a tiempo fijo, o IATF). Los tratamientos más recientes y actualizados controlan mejor la dinámica folicular que los tratamientos previos, principalmente al reducir la exposición a la progesterona de 10-14 días a 5-7 días (Tratamientos Cortos). Estos protocolos para IATF fueron el resultado de la contribución de varios estudios desarrollados principalmente en Uruguay (revisado por Menchaca & Rubianes, 2004) y consisten en el uso de un dispositivo intravaginal con progesterona durante 6 días asociado a una dosis de gonadotrofina coriónica equina (eCG) y prostaglandina (PG) F2alfa al momento de retirar el dispositivo. La IATF se realiza entre las 48 y 56 h luego de retirar el dispositivo con progesterona. Recientemente hemos generado nueva información -adicional a la existente- en programas de IATF a gran escala comparando los Tratamientos Cortos (6 días) con los tratamientos largos (14 días). Estos resultados aún no han sido publicados. En todos los trabajos utiliza-

mos dispositivos intravaginales con 0,3 g de progesterona (DICO, Syntex, Argentina). En uno de los experimentos utilizamos 1.750 ovejas multíparas que recibieron inseminación intrauterina mediante laparoscopia, donde la tasa de preñez fue significativamente mayor con el protocolo corto que con el protocolo largo (43,5% vs 37,8%, respectivamente; $P < 0,05$). En un siguiente experimento utilizamos 922 ovejas con IATF utilizando semen fresco por vía cervical en el que las hembras fueron tratadas durante 6 días (con dispositivos de 1er uso) o durante 14 días con dispositivos intravaginales de segundo uso (previamente utilizados durante 6 días). Así generamos dos situaciones contrastantes: una con progesterona alta por corto periodo de tiempo, y otra con progesterona baja por largo periodo de tiempo. Nuevamente, la tasa de preñez fue mayor con el Tratamiento Corto que con el Tratamiento Largo (41,2% vs. 29,1%, respectivamente; $P < 0,05$). Estos resultados confirman estudios previos que hemos reportado en ovinos y caprinos (Menchaca & Rubianes, 2004), y en general esta información agrega más evidencia al concepto de que a medida que los niveles de progesterona van bajando en aquellos tratamientos más largos, se promueven ciertas condiciones que conducen a una menor fertilidad.

De forma adicional, aplicando estos Tratamientos Cortos de 6 días en algunos casos es posible reutilizar los dispositivos al menos una vez. Si bien los dispositivos fueron diseñados para utilizarlos por 12 a 14 días en los protocolos tradicionales, y entonces al utilizarlos solo 6 días es razonable proponerse un segundo uso, es necesario tener en cuenta el concepto de que bajas concentraciones de progesterona durante el tratamiento afecta de manera negativa la fertilidad. Para evaluar este aspecto hemos realizado varios experimentos en ovejas (Vilariño et al., 2010; Vilariño et al., 2013; dos Santos Neto et al., 2015a) y cabras (Vilariño et al., 2011). Cuando utilizamos un CIDR encontramos que su reutilización, si bien induce menores concentraciones de progesterona en sangre, permite una respuesta ovárica similar a la que se obtiene con un dispositivo nuevo de primer uso. Esta respuesta aceptable a nivel ovárico ocurre aun cuando el CIDR es usado por dos o tres veces. Sin embargo, estos estudios también mostraron que la tasa de preñez fue significativamente menor con

los dispositivos utilizados por tercera vez vs. los dispositivos nuevos, mientras que el resultado fue intermedio para los dispositivos de segundo uso. Este menor resultado en la tasa de preñez estuvo asociado con un menor recambio folicular encontrado en las hembras que recibieron un dispositivo reutilizado. Sugerimos entonces que los dispositivos reutilizados pueden generar resultados aceptables, pero con una fertilidad menor, lo que está asociado -al menos en parte- a problemas en la dinámica folicular y el normal funcionamiento de las ondas foliculares.

En suma, diferentes trabajos reportados durante los últimos 15 años muestran que los Tratamientos Cortos resultan en una serie de beneficios frente a los protocolos largos utilizados anteriormente, al menos cuando se utiliza un dispositivo con progesterona tipo CIDR. Las ventajas se resumen en un mejor control de la respuesta folicular y la ovulación, tasas de fertilidad aceptables (en general superiores y nunca inferiores que los tratamientos convencionales), un período más corto necesario para su implementación que puede ser importante en ciertos casos, y eventualmente es posible reutilizar los dispositivos de silicona disminuyendo el costo del tratamiento. En general, estas ventajas en los protocolos favorecen que se incremente la adopción de la inseminación artificial, haciendo que esta tecnología alcance un mayor impacto en la mejora genética de los rebaños.

SUPEROVULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES.

El avance del conocimiento sobre la dinámica folicular mencionado anteriormente también permitió el desarrollo de nuevos tratamientos de superestimulación ovárica para la producción y transferencia de embriones. En la actualidad existen nuevas alternativas para sincronizar la emergencia de una onda folicular y obtener una mejor respuesta superovulatoria, aprovechando el reclutamiento que normalmente ocurre con el inicio de la onda evitando así el efecto adverso de la dominancia folicular. Uno de los tratamientos más novedosos es el Protocolo Día 0 o tratamiento de superovulación de la Onda 1, utilizado con éxito tanto a nivel experimen-

tal como en programas comerciales de producción de embriones (Menchaca et al., 2009; 2010). Este protocolo consiste en iniciar el tratamiento con FSH justo en el momento en que emerge la primera onda folicular luego de la ovulación, es decir al Día 0 del ciclo. Para esto es necesario previamente sincronizar la ovulación, lo que puede hacerse con el Tratamiento Corto descrito en la sección anterior, para comenzar la administración de FSH 72-84 h luego de retirar el dispositivo intravaginal ya que en este momento ha ocurrido la ovulación y está emergiendo la Onda 1. La administración de FSH en general se realiza en 6 u 8 dosis decrecientes administradas cada 12 horas aproximadamente. Luego de la superestimulación de la Onda 1 se induce la luteólisis con dos dosis de PGF2alfa administradas junto a las dos últimas dosis de FSH, posteriormente se sincroniza la ovulación con una dosis de GnRH 24 h luego de la primera dosis de PGF2alfa, y por último se realiza la inseminación 16 y 24 horas luego de la GnRH. Este tratamiento ha mejorado la producción de embriones comparado con los tratamientos tradicionales, tanto en ovejas como en cabras (revisado por Menchaca et al., 2010).

Recientemente hemos demostrado en ovejas que es conveniente la exposición del ovocito a altas concentraciones de progesterona previo a su maduración y reinicio de la meiosis (Cuadro et al., 2018; Menchaca et al., 2018). Por este motivo hemos incorporado al Protocolo Día 0 el tratamiento con un dispositivo intravaginal con progesterona durante la administración de FSH (desde la primera dosis de FSH hasta la primera dosis de PGF2). Para comprobar esto, en un primer experimento se superovularon 71 ovejas Merino 33 de las cuales recibieron el Protocolo Día 0 y las otras 38 recibieron el mismo protocolo más un dispositivo con 0,3 g de progesterona. Las ovejas tratadas con progesterona tuvieron una mayor tasa de fertilización (93,3% vs. 83,3%), un mayor número de embriones transferibles por donante ($5,4 \pm 0,6$ vs. $3,0 \pm 0,7$) y un mayor porcentaje de embriones de buena calidad (67,7% vs. 52,7%) que aquellas que no recibieron progesterona, respectivamente ($P < 0,05$). Estos resultados muestran con claridad que la suplementación con progesterona durante la superovulación de la Onda 1 mejora los resultados obtenidos con el Protocolo Día

O (Cuadro et al., 2018). Para profundizar en el mecanismo responsable de esta respuesta, realizamos otros estudios aspirando los folículos y evaluando la competencia ovocitaria en condiciones *in vitro* (ver abajo). La exposición del folículo preovulatorio a la progesterona mejoró claramente la calidad del ovocito (Menchaca et al., 2018). En general, los resultados confirman el beneficio de que los folículos preovulatorios y los ovocitos se desarrollen con altas concentraciones de progesterona, y a partir de estos resultados hemos incorporado esta estrategia en este protocolo.

Si bien los protocolos de superovulación de la Onda 1 son eficaces y en nuestra experiencia permiten mejores resultados que los protocolos tradicionales, muchos veterinarios los continúan utilizando ya que ha sido el procedimiento de rutina por más de 30 años. Estos protocolos convencionales fueron desarrollados en la década de 1980 y por este motivo están muy incorporados en la práctica cotidiana, principalmente en aquellos veterinarios que comenzaron a trabajar hace varios años antes de que se comprendieran los últimos conceptos sobre la dinámica folicular y la superestimulación ovárica. Por este motivo hace algunos años también intentamos perfeccionar estos protocolos convencionales y hemos obtenido mejoras interesantes. Los protocolos tradicionales consisten en la administración de FSH para estimular el número de folículos, tratamiento que se realiza luego de 14 días de exposición a la progesterona exógena. La progesterona se administra mediante un dispositivo intravaginal de silicona tipo CIDR, y la FSH se inyecta por vía im en 6 a 8 dosis normalmente comenzando 48 a 60 horas antes de retirar el CIDR. En un experimento sobre 239 ovejas donantes comparamos la duración del tratamiento con progesterona para determinar si era necesario un protocolo tan prolongado. El tratamiento con progesterona se administró mediante el uso de CIDR-G (0,3 g de progesterona, Zoetis) durante 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días (23 a 25 donantes en cada grupo experimental). Los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas y la producción de embriones fue similar, demostrando que no es necesario un tratamiento tan prolongado. En un segundo experimento evaluamos el uso de eCG asociado al tratamiento con FSH en 264 donantes (83 a 93 donantes

en tres grupos experimentales) demostrando que no es recomendable agregar una dosis de eCG al tratamiento con FSH (al momento de retirar el CIDR). En otro experimento evaluamos el uso de GnRH en 161 donantes (78 y 83 donantes por grupo) y demostramos que es conveniente agregar una dosis de esta hormona a las 24 h luego de retirar el CIDR. En suma, si bien los protocolos tradicionales han mostrado inducir menos embriones o de peor calidad que los protocolos de la Onda 1, en caso de utilizar dichos tratamientos se recomienda administrar la progesterona durante 5 a 14 días, evitar el uso de eCG junto con la FSH, y administrar una dosis de GnRH 24 h luego de retirar el dispositivo con progesterona. Cuando este protocolo convencional mejorado lo comparamos con el Protocolo Día 0, los mejores resultados se obtuvieron con este último tratamiento (revisado por Menchaca et al., 2010).

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*.

La obtención de ovocitos por punción folicular mediante laparoscopia (*Laparoscopic ovum pick-up*, LOPU) y la producción de embriones *in vitro* (PIV) son dos tecnologías que combinadas permiten maximizar la capacidad reproductiva de una hembra. Así se pueden coleccionar ovocitos de cada oveja en forma frecuente y por periodos prolongados, y aun cuando normalmente no están ovulando (antes de la pubertad, durante el anestro, o durante la gestación). Estas herramientas tienen un gran impacto en aprovechar al máximo la reserva folicular de una hembra. La mejor comprensión del desarrollo ovocitario y embrionario nos ha permitido mejorar esta tecnología y obtener resultados aplicables en condiciones comerciales de producción (Menchaca et al., 2016a). En Uruguay, si bien hace algunos años nacieron los primeros corderos por esta tecnología (Menchaca et al., 2012), al igual que en el resto del mundo la adopción de la misma en sistemas de producción ovina aún es baja. No obstante, esta herramienta también es de utilidad y absolutamente necesaria para aplicar otras tecnologías más complejas como la clonación, transgénesis y producción de animales por edición genómica. Para aspirar los folículos ováricos, existen diferentes tratamientos de estimulación folicular que se administran previo a la LOPU. En general, las hembras son sincronizadas me-

diante el uso de un progestágeno durante varios días (p. ej. 10-12 días) y 36 h antes de la LOPU se administra una dosis de FSH; el retiro del dispositivo se realiza al momento de la aspiración. Luego de comparar diferentes protocolos Baldassarre & Karatzas (2004) recomiendan una dosis única de 80 mg de FSHp + 300 UI de eCG 36 h previo al momento en que se realiza la aspiración. Este es el tratamiento de elección tanto en ovejas como en cabras con una media reportada por Baldassarre & Karatzas (2004) de aproximadamente 8 a 10 ovocitos recuperados por hembra. Recientemente hemos evaluado nuevos tratamientos que tienen en cuenta la dinámica folicular y consideran el reclutamiento y la dominancia (Menchaca et al., 2018).

Diferentes estudios en ovejas y cabras han demostrado que los ovocitos obtenidos por aspiración folicular y madurados *in vitro* (MIV) tienen una menor competencia en comparación con los madurados *in vivo* (Cognié et al., 2003), sugiriendo condiciones inadecuadas de IVM, pero también debido a una menor calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración. La competencia de los ovocitos se ve afectada por el tamaño y la fase de desarrollo del folículo del que se colecta el CCO (Crozet et al., 1995). Esto está determinado por la dinámica y la dominancia folicular ampliamente estudiada en bovinos (Adams et al., 2008). El método ideal para aspirar ovocitos de buena calidad debe asegurar una población homogénea de folículos medianos (≈ 4 mm) y nuevos (en fase de crecimiento o estática) que contengan ovocitos sanos y nunca en atresia. Con esto en mente, recientemente hemos evaluado nuevas ideas para el control folicular antes de la LOPU en ovejas. Anteriormente habíamos descrito el Protocolo Día 0 para la superestimulación de la primera onda folicular utilizado en la producción convencional de embriones o programas MOET (Menchaca et al., 2002, 2007, 2009, 2010). En ese Protocolo Día 0, la FSH se administra en varias dosis dos veces al día, con la primera dosis administrada poco después de la ovulación del ciclo anterior, coincidiendo con el reclutamiento folicular de la Onda 1. Más recientemente, hemos evaluado este mismo protocolo pero asociado a LOPU. En este caso administramos una dosis única de 80-100 mg de pFSH

el Día 0 (es decir, 84 h después de la eliminación del dispositivo cuando ya ocurrió la ovulación). Para esto la FSH es reconstituida en MAP-5 (Vetoquinol, Francia) que contiene ácido hialurónico permitiendo una liberación lenta de la hormona. En este estudio, la LOPU se realizó 72 h después de la dosis de FSH (al Día 3 del ciclo). Los resultados mostraron un mayor número de folículos aspirados y una mejor calidad de los ovocitos (Menchaca et al., 2018), lo que alienta estudios más profundos sobre este nuevo enfoque para resolver esta limitante y mejorar la calidad de los ovocitos que son destinados a la PIV.

Una vez que los ovocitos son recuperados luego de la aspiración folicular, son sometidos a la maduración, fertilización y cultivo *in vitro* en estufa de cultivo bajo condiciones específicas de temperatura, humedad, concentración de gases, nutrientes, hormonas y factores de crecimiento. Existe una gran variedad de medios utilizados por diferentes grupos que difieren en sus componentes, en la concentración de los mismos o en los procedimientos. Los detalles utilizados en nuestro laboratorio están descritos en profundidad en Menchaca et al., 2016a. Luego de 6 días de cultivo *in vitro*, los embriones ovinos alcanzan el estadio de blastocisto y pueden ser transferidos a receptoras o criopreservados para su posterior uso. Los resultados con esta metodología aplicada en nuestro laboratorio sobre datos acumulados de 25.335 ovocitos procesados en 3 años, muestran una tasa de ovocitos viables de 64%, una tasa de clivaje a las 48 horas cercana al 80%, con un desarrollo posterior a blastocisto variable entre el 30 y 50%. La tasa de preñez que hemos obtenido luego de la transferencia de los embriones frescos al Día 6 de desarrollo en general oscila entre 40 y 50%.

La sobrevivencia a la congelación/descongelación de los embriones producidos *in vitro* es muy baja, y esto aún continúa siendo una limitante para esta tecnología. Al comparar la tasa de preñez con embriones congelados en etilenglicol producidos *in vitro* versus producidos *in vivo*, sobre un total de 136 embriones transferidos obtuvimos un 7% versus un 46% de preñez, respectivamente (dos Santos-Neto et al., 2017). Este bajo resultado con la congelación de embriones *in vitro* refleja una de

las principales limitantes para que el sector productivo pueda adoptar la fertilización *in vitro*, siendo necesario que los programas se realicen con embriones frescos. La congelación lenta fue desarrollada para embriones producidos *in vivo*, sin embargo los embriones producidos *in vitro* tienen algunas diferencias intrínsecas que afectan negativamente su criotolerancia, lo que está asociado con acumulación excesiva de lípidos, alteración del metabolismo, cambios en las características estructurales y físicas del embrión, entre otros. Por esta razón, como alternativa a la congelación convencional se ha intentado superar esta dificultad mediante la técnica de vitrificación. Los métodos de vitrificación para embriones producidos *in vitro* se han estudiado en diferentes especies, tanto en animales de producción como en especies en riesgo de extinción, y también son aplicados de rutina en reproducción asistida humana permitiendo la criopreservación exitosa de ovocitos y embriones. En pequeños rumiantes, se han realizado varios estudios para probar diferentes métodos de vitrificación de embriones (Traldi et al., 1999, Dattena et al., 2000, Baril et al., 2001, Martínez et al., 2006, Gibbons et al., 2011; Morato et al., 2011). En general, la eficacia de la técnica de vitrificación depende de varios factores además de la especie con la que estemos trabajando, como la etapa de desarrollo del embrión, el origen del embrión (*in vivo* o *in vitro*), el volumen a vitrificar, la velocidad de enfriamiento, los medios crioprotectores, entre otros. No obstante, hasta hace muy poco tiempo los resultados de sobrevivencia embrionaria y particularmente la tasa de preñez luego de la vitrificación de embriones producidos *in vitro*, en el mejor de los casos eran apenas aceptables en ovinos como en caprinos (20 al 30%, Cognie et al., 2004).

Más recientemente han surgido nuevos métodos de vitrificación que consisten en el uso de un volumen mínimo de medio ($\square 0,1 \mu\text{L}$) en el cual se coloca el embrión para ser vitrificado, permitiendo una vitrificación mucho más rápida aun que los sistemas previos de vitrificación. El método más conocido que utiliza esta estrategia de vitrificación ultrarrápida y mínimo volumen es el Cryotop (Kuwayama et al., 2007) y lo hemos utilizado con buen éxito en nuestro laboratorio, a la vez que hemos evaluado un nuevo método más económico conocido como Espátula MVD (dos Santos-Neto et

al., 2015b). Estos dos métodos de vitrificación han sido descritos previamente para humanos (Kuwayama, 2007) y embriones de ratones (Tsang & Chow, 2009), respectivamente. Estos nuevos métodos de vitrificación ultrarrápida disminuyen los daños estructurales y funcionales del embrión (Yavin & Arav, 2007, Arav, 2014). En un experimento reciente realizado en ovejas (Menchaca et al., 2016a; dos Santos-Neto et al., 2017), se transfirieron 437 embriones para comparar la tasa de sobrevivencia de embriones producidos *in vivo* versus *in vitro* sometidos a vitrificación por Cryotop o Espátula MVD, o a congelación convencional. Como era de esperar, independientemente del método de criopreservación, la tasa de preñez fue mayor con los embriones *in vivo* que con los embriones *in vitro* (tasa de preñez de 68,8 vs. 22,3%, $P < 0,05$). Para ambos orígenes de embriones, la tasa de preñez fue mayor ($P < 0,05$) cuando la vitrificación se realizó por el método Cryotop (77,8 y 55,1%) que por congelación convencional (64,9 y 11,1%, respectivamente). Los resultados con el método Espátula MVD fueron intermedios para todas las variables evaluadas. Por lo tanto, al menos en nuestro sistema de producción el método Cryotop permite resultados promisorios, lo que podría favorecer la implementación de programas de transferencia de embriones producidos *in vitro* en especies de producción.

BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS PARA LA EDICIÓN DEL GENOMA.

La producción de embriones en el laboratorio representa una herramienta sumamente poderosa no solo para la mejora genética tradicional, sino también para el desarrollo de nuevas biotecnologías. Mediante la micromanipulación embrionaria es posible modificar, eliminar, silenciar o incorporar nuevos genes en etapas embrionarias tempranas y lograr así individuos con características más apropiadas para diversos fines (Menchaca et al., 2016b). Esta tecnología está disponible en nuestro laboratorio a partir de 2012 luego del nacimiento de los primeros corderos transgénicos reportados en Latinoamérica (Crispo et al., 2015a). Posteriormente en 2014 logramos además el nacimiento de nuevos corderos, pero no con transgénesis sino con una tecnología mucho más revolucionaria y novedosa: la edición del genoma. En estos corderos editados indujimos el bloqueo de la expresión del

gen de la miostatina, proteína que está vinculada al desarrollo y diferenciación muscular. Como resultado obtuvimos animales doble músculo, logrando así la producción de más carne en ovejas con genética Merino superfino (Crispo et al., 2015b). Estos animales fueron generados mediante el uso de la tecnología CRISPR-Cas, un sistema de edición de genes que ha revolucionado el campo de la biología. Esta tecnología permite obtener de forma rápida y sencilla animales *knock out* (KO) para uno o varios genes (algo que no era posible mediante la transgénesis), así como también incorporar un gen o una porción determinada de ADN al genoma para generar una nueva función nunca antes expresada en esta especie. Para lograr la edición génica o la edición del genoma, una construcción genética debe microinyectarse rápidamente luego de la fecundación en el cigoto recién formado, motivo por el cual la producción de embriones *in vitro* y la micromanipulación embrionaria son absolutamente necesarias. El sistema CRISPR-Cas consiste en diseñar una secuencia de ARN idéntica a la secuencia de ADN que se pretende modificar, de esta manera una vez inyectada en el cigoto esta construcción actúa como guía y reconoce de manera muy precisa mediante las reglas de complementariedad a la misma secuencia en el ADN. A su vez, a este ARN guía se le asocia una endonucleasa (Cas9) que funciona a modo de tijera molecular y que cortará el ADN en el sitio preciso al que fue dirigida por el ARN guía microinyectado. Una vez que ocurre el corte de la doble cadena de ADN, el proceso de reparación que normalmente ocurre puede darse de dos maneras: a) desapareciendo o sustituyendo algún nucleótido en esta porción de corte por lo que el gen pierde su función y la proteína para quien codificaba no estará presente en el nuevo individuo (generando un animal *knock out*, KO); o b) insertando una secuencia preestablecida que dará lugar a una función conocida, por ejemplo para corregir un gen o agregar una nueva proteína en el individuo (animal *knock in*), y para esto hay que incluir dicha secuencia en la construcción inyectada. Por todo esto, el mecanismo descrito es completamente diferente al de transgénesis, permitiendo así editar o corregir el genoma de manera muy precisa (Menchaca et al., 2016b).

En el modelo KO para miostatina, el gen que codifica para esta proteína fue modificado en sitios muy precisos bloqueando su función y haciendo que esta proteína no se exprese en estos corderos. Como consecuencia, el desarrollo de los animales KO luego del nacimiento fue mayor que el de los corderos control que no habían sido editados (el peso corporal fue 25% superior a los 90 días luego de nacidos; $P < 0,05$), manteniendo las mismas características de lana superfina del Merino que fue la raza que utilizamos como fondo genético. A partir de estos primeros resultados en estos corderos, la tecnología se viene aplicando en otros modelos ovinos en diferentes países (principalmente en China y luego en EEUU). Al mismo tiempo han habido avances similares en caprinos, y en bovinos el primer reporte fue bastante más reciente (Gao et al., 2017). También hemos generado otros modelos KO por la tecnología CRISPR-Cas también en ovinos para estudiar aspectos más fundamentales de ciertas proteínas endógenas, para generar animales resistentes a enfermedades virales, así como para avanzar en la terapia de patologías en humanos de origen genético utilizando modelos ovinos.

En suma, el desarrollo de la biología molecular y la ingeniería genética ha permitido en los últimos años grandes avances en el conocimiento y en la edición del genoma. Las biotecnologías reproductivas han hecho posible utilizar este conocimiento para generar embriones y animales con ciertas mejoras del genoma, e incorporar o mejorar características de interés productivo en las especies tradicionales. Asimismo, es posible generar animales como biorreactores para la producción de fármacos en su leche, o incluso avanzar en terapias médicas y xenotransplantes, de manera mucho más precisa, más rápida, más fácil y más económica que con la transgénesis clásica. La edición del genoma es absolutamente disruptiva y está abriendo paso a una nueva etapa en las ciencias de la vida en general, lo que también se reflejará en la producción ganadera futura. En este contexto, las biotecnologías de la reproducción han contribuido de manera significativa con este avance.

CONCLUSIÓN

La mejor comprensión de la fisiología ovárica y del desarrollo embrionario ha contribuido a mejorar o incluso desarrollar nuevas herramientas tecnológicas aplicadas a la reproducción de los rumiantes. Así es posible multiplicar de manera significativa la genética de aquellos individuos de interés acercándonos a su máximo potencial reproductivo, pero también es posible generar nuevos animales con genomas editados de acuerdo a nuestros intereses. Muchas de estas biotecnologías hoy están disponibles en todos los países de Latinoamérica, mientras que otras más modernas aún no han llegado al sector primario encontrándose en una fase de desarrollo. Todas ellas representan un importante aporte en diferentes ámbitos, algunas contribuyen a la producción ganadera a pequeña o gran escala, y otras son utilizadas en áreas más básicas de la ciencia, o incluso en aplicaciones biomédicas o farmacéuticas.

Bibliografía

- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 72-80.
- Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 2014, 81:96-102.
- Baldassarre H, Karatzas CN. Advanced assisted reproduction technologies in goats. *Anim Reprod Sci* 2004; 82: 255-266.
- Baril G, Traldi AL, Cognie Y, Leboeuf B, Beckers JF, Mermillod P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 2001; 56: 299-305.
- Cognie Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P. State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 437-445.
- Cognie Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P. State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 437-445.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Creneguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One* 2015b; 10: e0136690.
- Crispo M, Vilariño M, dos Santos-Neto PC, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Barrera N, Mulet AP, Nguyen TH, Anegón I, Menchaca A. Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transg Res* 2015a; 24: 31-41.
- Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 293-298.
- Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Pinczak A, Barrera N, Crispo M and Menchaca A. Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep. *Anim Reprod Sci* 2018; 196: 205-210.
- Dattena M, Ptak G, Loi P, Cappai P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 2000; 53: 1511-1519.
- Dos Santos-Neto PC, Cuadro F, Barrera N, Crispo M, Menchaca A. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. *Cryobiology* 2017; 78: 8-14.
- Dos Santos-Neto PC, García-Pintos C, Pinczak A, Menchaca A. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using Short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Sci* 2015a; 182: 125-128.
- Dos Santos-Neto PC, Vilariño M, Barrera N, Cuadro F, Crispo M, Menchaca A. Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology* 2015b; 70: 17-22.
- Evans ACO. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 289-306.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q, Cui C, Liu X, Zhang J and Zhang Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol* 2017; 18(1), 13.
- Gibbons A, Cueto MI, Pereyra Bonnet F. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Rumin Res* 2011; 95: 61-64.
- Kuwayama M. Highly efficient vitrification

for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method, *Theriogenology* 2007; 67: 73-80.

• Martínez AG, Valcárcel A, Furnus CC, de Matos DG, Iorio G, de las Heras MA. Cryopreservation of *in vitro* produced ovine embryos, *Small Rum Res* 2006; 63: 288-296.

• Menchaca A, Anegón I, Whitelaw CB, Baldassarre H, Crispo M. New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology* 2016b; 86: 160-169.

• Menchaca A, Barrera N, dos Santos-Neto PC, Cuadro F, Crispo M. Advances and limitants of *in vitro* embryo production in sheep and goat. *Animal Reproduction* 2016a; 13: 3, 273-278.

• Menchaca A, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Bosolasco D, Barrera N, de Brun V, Crispo M. Oocyte developmental competence is improved by relatively greater circulating progesterone concentrations during preovulatory follicular growth. *Anim Reprod Sci* 2018; 195: 321-328.

• Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 2002; 58: 1713-1721.

• Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with Timed Artificial Insemination in small ruminants. *Reprod Fert Dev* 2004; 16: 403-414.

• Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, de Castro T, Rubianes E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 113-118.

• Menchaca A, Vilarino M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E. 2007. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology* 2007; 68: 1111-1117.

• Menchaca A, Vilariño M, dos Santos-Neto PC, Wijma R, Pinczak A, de Castro T, Crispo M. Producción de los primeros corderos por fertilización *in vitro* en Uruguay. Congreso Uruguayo de Producción Animal, 2012 [resumen].

• Menchaca A, Vilariño M, Pinczak A, Kmaid S, Saldana JM. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 2009; 72: 477-483.

• Morato R, Romaguera R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Vitrification of *in vitro* produced goat blastocysts: effects of oocyte donor age and development stage. *Cryobiology* 2011; 63: 240-244.

• Rubianes E, Menchaca A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 271-287.

• Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P. Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 1999; 51:175. (abstract).

• Tsang WH, Chow KL. 2009. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques* 2009; 46: 550-552.

• Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology* 2013; 79: 206-210.

• Vilariño M, Rubianes E, Menchaca A. Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology* 2011; 75: 1195-1200.

• Vilariño M, Rubianes E, van Lier E, Menchaca A. Serum progesterone concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO) in sheep. *Small Rum Res* 2010; 91: 219- 224.

• Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007; 67: 81-89.