

# TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

## APLICADA AL MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL GANADO\*

**LUIZ NASSER**

*Médico Veterinario.*

*Doctorado en reproducción animal.*

*Responsable Técnico del Departamento de Transferencia  
de embriones de la alianza VITROGEN.CO.*

*Responsable Técnico de FIRMASA, empresa especializada  
en el manejo reproductivo de rebaños Bovinos  
en Campo Grande, Brasil.*

*E-mail: lfnasser@terra.com.br*

*Brasil*

\* Traducido del Portugués al Español por el M.V. Pablo Lopera.  
Asistencia Técnica COLANTA

## Introducción

La mayoría de rebaños de carne están localizados en regiones tropicales donde predominan los animales Bos Indicus. Los animales puros y sus cruces también son importantes para los rebaños lecheros situados en la misma región. Informaciones relacionadas con aspectos reproductivos, tales como tasa de nacimiento, sobrevivencia neonatal e intervalo entre partos, tienen grandes variaciones cuando se comparan con animales de origen Bos Taurus. Hoy no existen dudas de que las razas de origen Bos Indicus y sus cruces son superiores a las de origen europeo cuando se encuentran en ambientes tropicales o subtropicales donde predominan factores que producen estrés como las altas temperaturas y humedad, ectoparásitos y forrajes pobres.

La aplicación de biotecnologías tales como Inseminación Artificial (I.A.), transferencia de embriones (T.E.) y producción de embriones vía Fecundación In Vitro (FIV), son herramientas disponibles para la multiplicación genética desde material comprobadamente superior y que permiten alcanzar altos índices de productividad, similares a los encontrados para otras razas en situaciones adversas.



No obstante, estas nuevas técnicas biotecnológicas en nuestros sistemas de manejo de animales, no siempre se logran los mismos efectos que los alcanzados en otros hemisferios; por tal motivo, es importante resaltar que existen particularidades entre las razas que influyen en los resultados de cada una de las técnicas utilizadas.

Una gran cantidad de experimentos se están desarrollando por nuestro equipo de trabajo cubriendo las biotécnicas en mención, con la intención de facilitar su aplicación práctica para nuestras condiciones de trabajo y nuestros animales.

Estas investigaciones han sido publicadas y han demostrado su viabilidad y aplicación a gran escala para los sistemas de producción brasileros y, también, para otros países de América.

## 1. Ciclo estral y dinámica folicular en bovinos

La duración del ciclo estral de los bovinos varía entre 17 y 25 días, con semejanzas entre las hembras cebuínas y taurinas (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995; SIROIS; FORTUNE, 1998; VACA et al., 1985). En ese intervalo, el desarrollo folicular se presenta como una secuencia dinámica de eventos fisiológicos y endocrinos que involucran el crecimiento o la atresia (ausencia congénita u obstrucción de un conducto o abertura corporal) de los folículos antrales, con movimientos que se asemejan a ondas (PIERSON; GHINTER, 1984).

Esta teoría de las ondas foliculares ha sido propuesta por Rajakoski (1960), quien realizó estudios histológicos en ovarios obtenidos en frigoríficos. Con base en las observaciones realizadas, el autor sugirió la existencia de dos ondas de desarrollo de folículos antrales durante el ciclo estral, cada una presentando un folículo que crecía hasta alcanzar un diámetro preovulatorio.

Con el uso de ultrasonografía, técnica de evaluación no invasiva en tiempo real, otros estudios comprobaron la teoría de que el crecimiento de los folículos se daba en forma de ondas, y verificaron que cada ciclo tenía de dos a cuatro ondas de crecimiento folicular (PIERSON; GINTHER, 1988; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988). Con ese tipo de examen fue posible analizar la dinámica folicular mediante la correlación temporal entre los eventos endocrinos y la aparición de estructuras ováricas no correspondientes al ciclo estral (ADAMS et al., 1992a, 1992b; GINTHER; KASTELIC; KNOPE, 1989a; SIROIS; FORTUNE, 1988).

La primera onda de crecimiento folicular inicialmente identificada el día de la ovulación (Día 0) es reconocida por el equipo de ultrasonografía gracias a la visualización de un grupo de folículos antrales (3 a 5 mm.) como respuesta a las gonadotropinas. Esa etapa, denominada fase de reclutamiento, está asociada a la



1993), responsables de la biodisponibilidad de receptores para FSH. Esa biodisponibilidad de receptores para FSH ya está presente en mayor cantidad en el folículo dominante desde el momento en que éste es identificado como FD, lo que demuestra su actuación de dominante en concordancia con la emergencia de la onda folicular.

El proceso de crecimiento y de atresia de los folículos perdura siempre y cuando el cuerpo lúteo sea funcional y esté produciendo progesterona, lo mismo que ocurre durante la gestación (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b). Cuando no ha habido un reconocimiento materno de la gestación, determinado principalmente por la producción de interferón trofoblástico, y finalizado por las células del endometrio, ocurre el proceso de luteólisis (TATCHER et al., 2001). El momento de la regresión del cuerpo lúteo, determina si el FD será un folículo ovulatorio (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b). El crecimiento del FD promueve el aumento de las concentraciones de estrógenos, el cual desencadena el mecanismo de retroalimentación positiva para la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y el consecuente pico de LH, promoviendo la ovulación (FORTUNE, 1993).

## 2. Fisiología reproductiva en Bos Taurus y Bos Indicus

Los estudios indican que características como el número de ondas por ciclo, el crecimiento folicular y la dominancia, son similares para las hembras Bos Taurus y Bos Indicus (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995; BO et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998; GINTHER, KASTELIC; KNOPF, 1989a; SIROIS; FORTUNE, 1988).

A pesar de las semejanzas en el patrón de crecimiento folicular, se han reportado diferencias morfológicas y endocrinas (RANDEL, 1989). Los animales Bos Indicus presentan diámetros máximos de FD entre 10 y 12 mm. y de CL entre 17 y 21 mm. (BO et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 1997) menores que los característicos en Bos Taurus, cuyos diámetros son: FD, 14 a 20 mm. y CL, 20 a 30 mm. (BO et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 1997; GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b). La diferencia del tamaño del cuerpo lúteo tiene una implicación práctica para los animales, dado que dificulta su identificación vía palpación rectal. Ya se describió que la cantidad de progesterona presente en el cuerpo lúteo de animales Bos Indicus, es menor que aquella observada en animales Bos Taurus, lo que sugiere una disminución de los niveles circulantes de progesterona en éstos últimos (SERGERSON et al., 1984). Randel (1989) expuso la hipótesis de que un menor tamaño de cuerpo lúteo en los animales Bos Indicus sería el resultado de una menor respuesta a los estrógenos, menor pico preovulatorio de LH y diferencias endocrinas relacionadas con los eventos que culminan con la ovulación.



sería difícil obtener una mejor respuesta en ese grupo de animales. El segundo número de donadoras presentaba gran cantidad de folículos al inicio del tratamiento, pero éstos ya estaban fisiológicamente entrando en atresia. Ese grupo de animales podría presentar mejor respuesta, en caso de haber implementado un tratamiento con FSH al inicio de la onda folicular.

Originalmente, se consideraba que el momento ideal para el inicio del tratamiento superovulatorio con gonadotropinas sería aquél en el que los folículos estuviesen madurando y tuvieran una alta concentración de estrógenos, cosa que ocurre entre los días 7 y 13 del ciclo estral (IRELAND; ROCHE, 1982).

Lindsell, Murphy y Mapletoft obtuvieron mejor respuesta superovulatoria en tratamientos iniciados el día 9 del ciclo que en los tratamientos iniciados los días 3, 6 o 12.

Guilbault et al. (1991) verificaron que la respuesta superovulatoria decrecía de un 40% a un 50% cuando los tratamientos eran iniciados en presencia de un folículo dominante. Romero et al. (1991) y Van Der Schans et al. (1991) constataron que había una alta correlación entre el número de folículos pequeños (3 a 6 mm.) al inicio del tratamiento de superestimulación y la respuesta superovulatoria. La interpretación conjunta de los casos sugiere que la respuesta a los tratamientos de superestimulación iniciados cuando el FD ya está ejerciendo su dominancia es baja, y que la mejor respuesta superovulatoria ocurre cuando los tratamientos son iniciados en presencia de un *pool* de pequeños folículos en crecimiento. Así pues, el momento ideal para dar inicio a ese tipo de tratamiento sería el inicio de una nueva onda de crecimiento folicular (GILBAUT et al., 1991; NASSER et al., 1993).

## 4. Manipulación de la dinámica folicular.

### 4.1 Priming Folicular.

El *priming* fue concebido para mimetizar el pico endógeno de FSH que ocurre antes del inicio de cada onda folicular a través de la aplicación de gonadotropinas, promoviendo el aumento del número de folículos reclutados que emerge en una nueva onda subsecuente al tratamiento (ADAMS, 1994). Rajamahendran et al. (1997) y Touati et al., (1991) demostraron efectos benéficos de los pre-tratamientos con gonadotropinas sobre la respuesta superovulatoria, pero otros autores no obtuvieron el mismo resultado. Ya, Grasso et al., (1989) y Guilbault et al., (1991) constataron que los pre-tratamientos surten efecto adverso sobre la superovulación. Ese efecto adverso podría estar relacionado con el momento del inicio de los tratamientos, pues aquellos iniciados después del segundo día del ciclo pueden estimular el desarrollo de un FD, llevando los folículos subordinados a la atresia.

Murphy et al., (1984), observaron que las gonadotropinas procedentes de extracto de pituitarias presentaban diversos grados de contaminación con LH en su constitución. Ese producto contaminado con LH, cuando es utilizado para el *priming*, podría promover la luteinización del FD y no la estimulación de los demás folículos. Ahora, cuando fue utilizado FSH altamente purificado a partir de extracto de pituitaria, se verificó mejora en la respuesta superovulatoria, lo que demuestra el efecto benéfico de la FSH en estimular pequeños folículos antrales para que sean más sensibles a la respuesta a las gonadotropinas en tratamientos subsecuentes (TOUATI et al., 1991).

Entretanto, la eficiencia del *priming* en protocolos de superovulación está dividida, pues los estudios relacionados no presentaron regularidad, tanto con relación a los datos de los pre-tratamientos como con lo relacionado con la bioactividad de las gonadotropinas administradas.

#### 4.2 Aspiración Folicular.

De acuerdo con Adams et al., (1992), un día después de la remoción del FD por electrocacerización se inicia un pico de FSH, responsable de la emergencia de una nueva onda folicular cerca de dos días después de la cauterización.

Otra manera de eliminar el FD (que en la actualidad es rutinariamente utilizada en los Programas de Aspiración Folicular y Fertilización In Vitro) es la aspiración por punción ovárica guiada por ultrasonografía. En una tentativa para aprovechar ese método de sincronización de onda folicular para programas de superovulación, Bergfelt et al. (1997) compararon dos grupos de novillas superovuladas: en el primer grupo, la superovulación fue iniciada un día después de la aspiración y la remoción del FD; en el segundo grupo (control) los tratamientos con FSH se iniciaron los días 8, 9, 10, 11 y 12 después de la observación del calor. La cantidad de embriones y/o estructuras colectadas, tanto en número como en porcentaje de embriones viables, no diferían entre los grupos.

A pesar de no haber existido diferencia significativa entre los grupos, los autores identificaron una deficiencia en el diseño experimental del grupo aspirado, que inadecuadamente podría controlar la fase luteínica, causando ovulaciones prematuras y regresiones incompletas del cuerpo lúteo. Para controlar tal situación se realizó un segundo experimento, en el cual los animales del grupo que se estudió recibían un implante auricular de progestágeno conteniendo 6 mg. de norgestomet (Syncro-Mate-B) después de la aspiración. Nuevamente, no hubo respuesta significativa en la respuesta de superovulación entre los grupos, pero los grupos aspirados más progestágeno presentaron una respuesta más consistente con relación al número de embriones viables y transferibles, confirmando que es necesario el control del cuerpo lúteo (BERGFELT et al, 1997).

En otro estudio, animales sometidos a la aspiración del FD dos días antes del inicio de la superovulación –realizada durante el diestro- tuvieron mejor respuesta superovulatoria que aquéllos en los que la superovulación fue iniciada en presencia de un FD (BUNGARTS; NIEMAN, 1994).

Para evaluar la deficiencia en la utilización de GnRH en protocolos de superovulación, Khoram et al. (1995) compararon los animales que recibieron GnRH dos días antes de la superovulación, hembras superovuladas después de la aplicación de GnRH y la aspiración del FD, y animales superestimulados tradicionalmente entre los días 8 y 12 después del calor. Los resultados permitieron que los autores concluyeran que el tratamiento con GnRH asociado a la aspiración de un FD no fue mejor que la superovulación tradicional porque los animales del primer grupo presentaron gran número de estructuras no fertilizadas y degeneradas. Analizados conjuntamente, los resultados de la investigación indican la necesidad de controlar la fase luteínica para la obtención de estructuras viables, y la dificultad de la utilización de este procedimiento en programas comerciales de gran escala.

#### **4.3 Tratamiento con Progestágenos/Progesterona asociado al Estradiol.**

Actualmente, están disponibles en el mercado varios productos a base de progestágenos o de progesterona asociada al estradiol para protocolos de sincronización de dinámica folicular y de estro. La finalidad de esos productos es la reposición de un cuerpo lúteo natural por uno artificial para prevenir el calor y la ovulación. Inicialmente, la asociación entre progestágeno/ progesterona y estradiol tenía como objetivo inducir la liberación de prostaglandinas por el úteroy, consecuentemente, causar la luteólisis (WILTBANK; KASSON, 1968). Entretanto, después de descubrir la capacidad luteolítica en rumiantes, la prostaglandina y sus análogos se convirtieron en los agentes luteolíticos de elección, pues promueven mejores respuestas que las obtenidas con el estradiol (LEMOS, 1975).

Bo, Pierson y Mpletoft (1991) realizaron una serie de experimentos orientados a evaluar el efecto del estradiol y los progestágenos sobre la dinámica folicular. Los resultados demostraron que el estradiol exógenos inhibe el crecimiento del FD, efecto que es más acentuado cuando se utiliza una combinación de progestágeno más estradiol. Cuando el estradiol es aplicado a novillas sin un progestágeno, no se observa supresión del FD, consecuentemente, la emergencia de una nueva onda folicular es imprevisible (BO et al., 1996a).

Algunas investigaciones tuvieron como objetivo utilizar la emergencia de una onda folicular artificialmente manipulada en protocolos de superovulación. Meyer et al., 2000, verificaron que donadoras que recibieron implante de progestágenos el día de la ovulación (día 0), y en el día 1 fueron tratadas con 5 mg. de E-17B para sincronizar la emergencia de la onda cuatro días antes del inicio de la FSH, presentaron respuesta superestimuladora semejante a aquéllas

donadoras tratadas con protocolo de superovulación tradicional iniciado entre los días 8 y 12 después del calor.

Gracias a la disponibilidad comercial y a la eficiencia en la sincronización del inicio de la onda, el benzoato de estradiol es bastante utilizado en los protocolos de sincronización para los programas MOET (Transferencia de Embriones por Ovulación Múltiple). La aplicación de 2,5 mg. de BE (benzoato de estradiol) y 50 mg. de P4 (progesterona) en el momento de la inserción del dispositivo de progesterona *Controlled Internal Drug Release-B* (CIDR-B), indujo la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular sincronizada tres o cuatro días después del tratamiento (CACCIA; BO, 1998). La superovulación iniciada cuatro días después del tratamiento con 2,5 mg. de BE y 50mg. de P4 presentó respuesta semejante a la obtenida en superovulaciones iniciadas 8 a 12 días después del estro (MEYER et al., 2000).

Macmillan et al(1991) desarrollaron el sistema llamado *Controlled Internal Release* (CIDR) que consiste en un dispositivo intravaginal que contiene 1,9 g de P4 y una cápsula de gelatina que contiene 10 mg. de BE ingerida junto con un dispositivo intravaginal. Según los autores, la cantidad de P4 liberada por el dispositivo es altamente predecible, con valores medios de concentraciones de P4 en plasma alrededor de 5 a 6 ng/ml. y contenido medio residual de 0.91 g.

Evaluando el efecto de retroalimentación interactiva de P4 y de BE sobre la secreción de gonadotropinas, Macmillan y Burke (1996) constataron que la inclusión intravaginal de BE potencializa el efecto de P4 en la supresión de la LH. La utilización del BE vía intramuscular demostró ser más eficaz y eficiente en la sincronización de la emergencia de la onda folicular (BO et al., 1995b). Los protocolos con dispositivos intravaginales de progesterona con aplicación intramuscular de BE, asociados a los inductores de la ovulación como FSH y la LH, pasaron a hacer parte de los programas de superovulación, principalmente en Brasil, pues permiten la adecuación de los programas al tiempo del técnico, independientemente de la fisiología de la donadora (BARRO; NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2003).

#### **4.4 Superovulación en la Primera Onda de Crecimiento Folicular.**

Nasser et al., 1993, demostraron que es posible obtener respuesta superovulatoria estimulando los folículos en la primera onda de crecimiento folicular. Por tanto, los tratamientos con FSH deben iniciarse próximos al momento del pico endógeno de esa hormona, caracterizado por el reclutamiento de folículos emergentes en la onda. Los autores eligieron la primera onda, y no las subsecuentes, porque el día de la ovulación (día 0) puede ser utilizado como punto de referencia de la emergencia de la primera onda, que se inicia después de la ovulación. Los tratamientos fueron iniciados en el día -1 (un día antes de la ovulación), el día 0 (el día de la ovulación), el día +1 (un día después de la ovulación) y el día +2 (dos días después de la ovulación), respectivamente. Considerando que el cuerpo lúteo sería sensible a la

prostaglandina el día después del calor (MOMONT; SEGUIN, 1984) –o sea aproximadamente cuatro días después de la ovulación), se hicieron algunas modificaciones al protocolo de superovulación para ajustarlo a la fisiología ovárica. El protocolo de FSH pasó de 4 a 5 días, y la dosis de prostaglandina F2a fue doblada y aplicada el último día de la superovulación, de modo que el recién formado cuerpo lúteo tuviese tiempo de responder al tratamiento. El número de folículos >7mm. el último día de FSH fue mayor en los grupos de tratamientos iniciados antes de la selección del FD que en los grupos cuyos tratamiento fueron iniciados en los días D +1 y D +2. El análisis de estos resultados muestra el efecto benéfico de los tratamientos iniciados y que están próximos al pico endógeno de FSH, que a su vez, ofrece soporte para que los folículos subordinados crezcan y adquieran un tamaño preovulatorio. También, la capacidad que tiene el FD de disminuir, la respuesta superovulatoria queda demostrada: éste ya ejercía su dominancia sobre los subordinados un día después del inicio de la onda, antes de ser caracterizado y visualizado en el examen ultrasonográfico (NASSER et al., 1993).

En otros estudios (ADAM et al., 1994) los autores observan que, independientemente de la onda folicular utilizada, para que un número mayor de folículos crezca hasta alcanzar el tamaño preovulatorio, los tratamientos de superovulación deben ser iniciados en el momento de la emergencia, antes de la manifestación del FD. En conclusión, queda confirmado que es posible utilizar el momento de la ovulación como marco preciso de referencia para el inicio de la superovulación en protocolos iniciados en la primera onda.