

## **Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos**

**Colazo M.G<sup>1</sup> y R.J. Mapletoft<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Alberta Agriculture and Rural Development, Edmonton, AB, Canadá. <sup>2</sup>WCVM, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canadá.

### **Introducción**

Los productores de ganado en el mundo aprecian las ventajas de la inseminación artificial (IA). La implementación de esta tecnología en rodeos de leche es una opción de selección genética que ha resultado en un significativo aumento en la producción de leche por animal. Aunque la IA es quizás la biotecnología más costo/efectiva hasta el momento, la contribución genética materna permanece sin explotar. Por el contrario, cuando se aplica la transferencia de embriones, la parte materna tiene una considerable influencia sobre las tasas de respuesta genética. La implementación de esta tecnología permite acelerar la ganancia genética con la contribución de ambos sexos. Además, los productores comerciales tanto de ganado productor de carne como de leche se pueden beneficiar con programas de transferencia de embriones bien diseñados, con criterios de selección apropiados a sus medio ambientes y objetivos individuales (Seidel, 1981; Hasler, 2003).

### **Historia y actualidad de la transferencia de embriones**

La transferencia comercial de embriones en Norteamérica se desarrolló en los principios de los años setenta con la introducción de razas continentales (Betteridge, 1981; Betteridge, 2003). En los últimos 30 años la aplicación de esta tecnología ha ido en aumento (especialmente en el ganado lechero), con más animales seleccionados por su genética que por un fenotipo deseable (Smith, 1988; Gibson and Smith, 1989). La historia de la transferencia de embriones en el ganado bovino fue publicada por Seidel y Seidel en una publicación de la FAO en 1991 (<http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E00.HTM>). Este documento contiene numerosas imágenes de embriones bovinos e instrumental que es todavía usado en estos tiempos.



En Canadá, más del 70% de las transferencias de embriones se realizan en el ganado lechero y aproximadamente el 70% de los embriones producidos in-vivo son congelados anualmente, de los cuales 22.000 han sido exportados en el 2006 (Asociación Canadiense de Transferencia de Embriones, [www.ceta.ca](http://www.ceta.ca); Tabla 1). La mayoría de los embriones transferidos en Canadá son para aumentar la descendencia de hembras “elite” puro registradas. Este es el más importante uso de la transferencia de embriones en este país, donde de los 122 toros Holandos en el mercado para IA, 39 fueron producidos por transferencia de embriones (Datos del año 2006).

**Tabla 1.** Resumen de la actividad de transferencia de embriones in vivo en bovinos en Canadá (Año 2006). Datos preparados por el Dr. Reuben Mapletoft de la Universidad de Saskatchewan y Karen McDermott de la Asociación Canadiense de Transferencia de embriones.

	<b>Ganado</b>		<b>Total</b>
	<b>lechero</b>	<b>de carne</b>	
<b>Número de donantes</b>	<b>11.307</b>	<b>3.316</b>	14623
<b>Número de embriones colectados</b>	<b>70082</b>	<b>26203</b>	96285
<b>Número de embriones congelados (%)</b>	<b>46586 (66)</b>	<b>18982 (72)</b>	65568 (68)
<b>Embriones transferidos</b>			
<b>Número de embriones fresco</b>	<b>21438</b>	<b>3289</b>	24727
<b>Número de embriones fresco y sexado</b>	<b>1337</b>	<b>70</b>	1407
<b>Número de embriones congelado</b>	<b>18825</b>	<b>7127</b>	25952
<b>Número de embriones congelado y sexado</b>	<b>890</b>	<b>27</b>	917
<b>Numero de transferencias directas</b>	---	---	20458
<b>Número de embriones en stock</b>	---	---	64365
<b>Número de embriones exportados</b>	<b>13379</b>	<b>8797</b>	22176
<b>Número de embriones importados</b>	<b>156</b>	<b>171</b>	327

En el mundo, más de 121.000 donantes son superovuladas y más de 670.000 embriones transferidos (IETS, 2003). La mayoría de los embriones transferidos en el 2006, fueron congelados (53 vs. 47%), con algunas notables diferencias dependiendo de la región.



En cuanto a Europa, en el año 2007 el país con más embriones transferidos fue Francia con 28.442, mientras que España está ubicada en el número 12 con 1.257 embriones transferidos (IETS, 2003).

### **Producción de embriones in vitro**

Datos compilados por el Dr. Michel Thibier, de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), indican que alrededor de 41.000 embriones producidos in vitro habrían sido transferidos en el año 2000. Desde entonces, la producción de embriones in-vitro ha aumentado significativamente en todo el mundo con casi 300.000 embriones producidos en el 2006. Aunque la producción de embriones in-vitro ha aumentado notablemente en Norteamérica, la mayoría de los embriones han sido transferidos en Brasil y Asia (China, Japón y Corea).

En el año 2006, se produjeron en Canadá más de 127.000 embriones in-vitro, la mayoría obtenidos del ganado lechero (Tabla 2). Más de 30.000 de esos embriones han sido exportados, la mayoría a China.

**Tabla 2.** Resumen de la actividad de transferencia de embriones in vitro en bovinos en Canadá (Año 2006). Datos preparados por el Dr. Reuben Mapletoft de la Universidad de Saskatchewan y Karen McDermott de la Asociación Canadiense de Transferencia de embriones.

	<b>Ganado</b>		
	<b>lechero</b>	<b>de carne</b>	<b>Total</b>
<b>Número de embriones producidos por FIV</b>			
<b>De ovocitos colectados por OPU</b>	<b>377</b>	<b>13</b>	<b>390</b>
<b>De ovocitos colectados de ovarios</b>	<b>126750</b>	<b>---</b>	<b>126750</b>
<b>Número de embriones congelados</b>	<b>126753</b>	<b>---</b>	<b>126753</b>
<b>Embriones transferidos</b>			
<b>Número de embriones fresco</b>	<b>180</b>	<b>13</b>	<b>193</b>
<b>Número de embriones congelado</b>	<b>3</b>	<b>---</b>	<b>3</b>
<b>Número de embriones exportados</b>	<b>30600</b>	<b>---</b>	<b>30600</b>

**FIV** = fertilización in-vitro

**OPU** = del ingles ovum pick up; colección de ovocitos de animales in-vivo



El crecimiento de la producción y transferencia de embriones in-vitro en Norteamérica ha sido acompañado por el desarrollo de laboratorios en Universidades y centros privados. Los embriones son producidos de ovocitos colectados de ovarios provenientes de mataderos o de animales in-vivo. El primer método tiene dos desventajas, la primera es que la donante es anónima y no hay una gran oportunidad de selección. Si bien los animales donantes han sido enviados al matadero por alguna razón, esos animales no son genéticamente inferiores. Estudios realizados en la Universidad de Wisconsin han estimado que la producción de leche en esos animales es muy cercana a la producción media del rodeo general. Sin embargo, al no conocer la donante no se puede tampoco conocer el estado de salud. Por lo tanto, la posible remota transmisión de enfermedades sería la segunda desventaja de los embriones producidos con esta metodología.

La colección de ovocitos de animales in-vivo (OPU) no tiene las desventajas explicadas arriba. La identidad de las donantes es conocida y con esta técnica se puede colectar ovocitos de la misma donante hasta dos veces a la semana. Sin embargo, la técnica es cara (US\$ 150-200) y requiere personal capacitado. El número de ovocitos colectados varía de 0 a 5, por lo tanto de 1 a 2 embriones podrían ser producidos por colección. Esta producción podría ser aumentada a 3 embriones por colección si las donantes son previamente estimuladas con hormona folículo estimulante (FSH). Probablemente la superestimulación con FSH y la colección de embriones in-vivo es superior a la técnica de OPU en cuanto a el costo/beneficio. Sin embargo, con OPU se podría maximizar la producción de embriones con colecciones de ovocitos dos veces por semana y además, permitiría la producción de embriones en donantes preñadas o en aquellas que no responden a la superestimulación.

Uno de los problemas de los embriones producidos in-vitro es que la supervivencia después del congelamiento es menor que el de los embriones producidos in-vivo. Por lo tanto, la mayoría de esos embriones son transferidos en fresco y esto requiere la sincronización de receptoras con la producción de embriones.

En tres estudios diferentes, nuestro grupo de trabajo transfirió un total de 324 embriones Holando producidos in vitro y congelados. Las receptoras fueron vacas de carne con cría al pie que fueron sincronizadas con un protocolo del tipo Ovsynch. Los embriones fueron transferidos 7 días después de la segunda inyección de GnRH (hormona liberadora de las gonadotrofinas), a todas las receptoras que tenían un cuerpo lúteo,



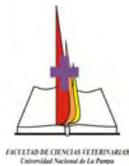
determinado por ecografía. El porcentaje de preñez promedio fue del 31%. El más alto porcentaje de preñez (43%) fue obtenido cuando un grupo de embriones fue congelado en una pajuela y después del descongelado, se transfirieron solamente los embriones de mejor calidad. Cuando las pajuelas fueron descongeladas y transferidas en forma directa el porcentaje de preñez fue del 22%.

### **Aplicaciones de la transferencia de embriones**

Desde hace muchos años la técnica de transferencia de embriones ha sido usada en investigación. Sin embargo, el uso de esta tecnología en esquemas de apareamientos es reciente. Ingeniería genética y otras tecnologías de la reproducción incrementarán el uso de la transferencia de embriones (Gibson and Smith, 1989). Por ejemplo, muchos laboratorios están usando técnicas de fertilización in vitro para estudiar la capacidad de fertilización del espermatozoide. Otros usos de la transferencia de embriones son descriptos en esta sección.

### **Mejoramiento genético**

Generalmente, el progreso genético ha sido considerado más lento con el uso de la transferencia de embriones que con IA convencional. Sin embargo, con un aumento en la intensidad de selección y acortando el intervalo generacional, la ganancia genética puede ser grande aun dentro del mismo rodeo (Smith, 1988; Bondoc et al., 1989; Christensen, 1991). Esto ha resultado en lo que se denomina grupo MOET (múltiple ovulación y transferencia de embriones) (Smith, 1988a; Smith, 1988b; Ruane and Smith, 1989). En varios países del mundo, núcleos genéticos están siendo desarrollados y las vaquillas están siendo superestimuladas (MOET juvenil), mientras los machos son seleccionados para la próxima generación de toros que serán usados en IA (Smith and Ruane, 1987; Teepker and Keller, 1989). De esta manera la ganancia genética es del doble. Además, ha sido estimado que la producción de 6 terneros por donante podría aumentar la intensidad de selección al doble (Smith and Ruane, 1987). Esto es muy valioso en rodeos "elite", cuya genética podría difundirse al resto de la población bovina a través del uso de la IA (Teepker and Keller, 1989; Lohuis, 1995). La transferencia de embriones podría ser usada para producir toros hijos de las mejores vacas y toros disponibles. De esta manera, la industria ganadera comercial se vería muy beneficiada.



Embriones producidos in vitro podrían ser transferidos para aumentar el mejoramiento genético, siempre y cuando la fertilización se realice con el semen proveniente de toros “elite”. Con la aplicación de la técnica de FIV el semen es amortizado con el aumento de progenie obtenida. Con la IA, asumiendo que la tasa de parición es 25%, se necesitaría inseminar 8 vacas para obtener una vaquilla. Sin embargo, con una sola pajuela de semen se inseminan 100 ovocitos que podrían resultar en 25 embriones transferibles que potencialmente producirían 3 vaquillas.

### **Apareamiento programado**

El uso más común de la transferencia de embriones es la proliferación de los llamados fenotipos deseables. La IA solo permite la diseminación del potencial genético de los machos. En cambio, la transferencia de embriones provee la oportunidad de diseminar el potencial genético de las hembras como el de los machos. El desarrollo de grupos de hembras “elite” es posible a través de la transferencia de embriones (Betteridge, 1981). Muchos criadores han identificado hembras cuya progenie es muy buscada y fácilmente vendible, por lo tanto esas hembras son usadas exclusivamente para transferencia embrionaria. También, la transferencia de embriones puede ser usada para propagar rápidamente un determinado grupo genético. El rápido desarrollo de la industria de la transferencia de embriones en Canadá en los años 70 fue el resultado directo de la introducción de razas europeas de ganado (“exóticas” en Canadá en esa época).

### **Evaluación genética**

El éxito de los programas MOET han conducido al uso de esta tecnología para evaluar genéticamente los toros que serán usados para IA (Teepker and Keller, 1989; Lohuis, 1995). La Asociación Canadiense de Criadores de Animales desarrolló un programa para la producción y evaluación de la nueva generación de toros para IA (Smith and Ruane, 1987; Teepker and Keller, 1989; Lohuis, 1995). Las hembras donantes fueron seleccionadas, superestimuladas e inseminadas con los mejores toros disponibles. La progenie de machos fue mantenida hasta que la progenie de hembras fue seleccionada de acuerdo a su producción. Por lo tanto, los futuros toros fueron seleccionados en base a la producción de sus hermanas y no a la de sus hijas. De esta manera fue posible evaluar genéticamente un toro en 3.5 años, mientras que el estudio de progenie



tradicional tarda 5.5 años. Aunque se disminuye la exactitud de selección, el acortamiento del intervalo generacional resulta en una mayor ganancia genética.

### **Control de enfermedades**

Ninguna de las enfermedades estudiada en bovinos ha sido transmitida por embriones producidos in vivo, cuando las recomendaciones del manejo de embriones fueron seguidas correctamente (Singh, 1998; Stringfellow, 1998, Stringfellow et al., 2004). Varios estudios han demostrado que si los embriones mantienen su zona pelucida intacta y son lavados (ver recomendaciones de la IETS), no transmiten enfermedades infecciosas. Consecuentemente, la transferencia de embriones podría ser utilizada para salvar el material genético, en el caso de brotes de enfermedades. Además, con el uso de la transferencia de embriones, se podrían establecer rodeos lecheros libres de Leucosis Bovina. Algunos criadores están usando la transferencia de embriones para establecer rodeos libres de enfermedades que serán usados exclusivamente para exportación (Stringfellow et al., 2004, Wrathall et al., 2004).

### **Importación y Exportación**

El transporte de animales vivos es muy costoso, mientras que con embriones congelados un rodeo entero podría ser transportado en un tanque de nitrógeno líquido. Además, cabe destacar que el beneficio más importante del uso de embriones en el comercio internacional es la reducción del riesgo de la transmisión de enfermedades (Mapletoft, 1987; Wrathall et al., 2004). Otros beneficios son, que se puede importar una más amplia variedad genética, que el país exportador conserva la genética y se observa una mejor adaptación del material genético importado. Esto último, es muy importante en climas tropicales y subtropicales, donde el embrión tiene la oportunidad de adaptarse primero en el útero y luego al pie de la madre receptora.

Sin embargo, existen algunos problemas potenciales en el movimiento internacional de embriones. En primer lugar, la distribución depende de la producción de embriones a bajo costo. Si bien la técnica de FIV produciría embriones más económicos, todavía es necesario mejorar las técnicas de congelación de embriones producidos in vitro (Hasler et al., 1997; Hasler, 1998). En segundo lugar, la introducción de enfermedades dentro de un país o área, a través del uso de embriones producidos in-vitro, es una gran



preocupación para las autoridades regulatorias. Aunque hay métodos muy bien definidos de recolección, manejo y lavados de embriones producidos in vivo, esto puede ser más difícil de realizar en los bovinos producidos in vitro (Stringfellow and Givens, 2000; Stringfellow et al., 2004). Finalmente, el éxito en el movimiento internacional de embriones depende fuertemente de técnicas adecuadas de transferencia, pues el personal involucrado en el país importador debe ser capaz de descongelar y transferir exitosamente los embriones.

### **Selección del sexo de la progenie**

Es bien conocido que los embriones pueden ser sexados. El método convencional consiste en la toma de una pequeña biopsia del embrión y luego se realiza un procedimiento llamado “la reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) para determinar la presencia del cromosoma “Y”. La biopsia del embrión requiere personal entrenado y equipamiento especial, por lo tanto es un procedimiento de costo elevado. Otras de las desventajas es que este procedimiento disminuiría la supervivencia de los embriones al congelado y los embriones no serían aptos para la exportación (debido a que la zona pelucida deja de ser intacta). Actualmente, con el advenimiento de la técnica de sexado de semen en bovinos, es posible producir embriones del sexo deseado.

Debido a la baja fertilidad del semen sexado, su uso no es recomendado en donantes superestimuladas pero sí lo es para la producción de embriones in vitro. En Canadá y USA, existen al menos 3 compañías que ofrecen embriones producidos con semen sexado. El 90% o más de los terneros producidos son del sexo deseado y el costo de un embrión Holando, producido in vitro (de ovocitos provenientes de ovarios de matadero) con semen sexado, ronda los 135 dólares americanos.

En un trabajo recientemente publicado (Xu et al., 2006), embriones Holando producidos in vitro con semen convencional o sexado fueron transferidos a receptoras Holando o de una raza nativa de China. Un tercer grupo de embriones producidos in vivo fueron usados como control. Los embriones producidos in vitro fueron vitrificados mientras que los embriones producidos in vivo fueron criopreservados en glicerol. Los porcentajes de preñez en receptoras diagnosticadas a los 77 días de gestación son mostrados en la Tabla 3.



**Tabla 3.** Porcentajes de preñez en receptoras transferidas con embriones producidos in vitro con semen convencional o sexado, o aquellas transferidas con embriones producidos in-vivo.

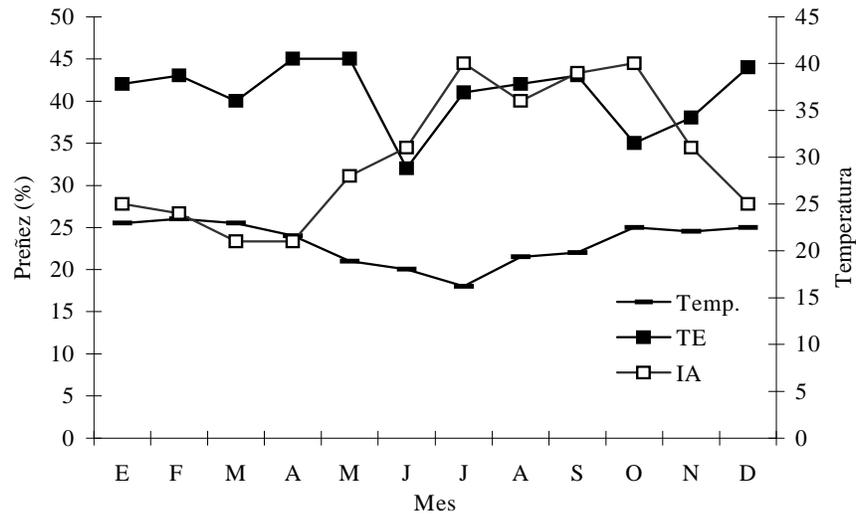
<b>Tipo de Embrión</b>	<b>Nro. de transferencias</b>	<b>Preñez (%)</b>
<b>In-vitro, semen sexado</b>	<b>3.627</b>	<b>41</b>
<b>In-vitro, semen convencional</b>	<b>481</b>	<b>42</b>
<b>In-vivo, semen convencional</b>	<b>192</b>	<b>53</b>

### **Sistemas de cruzamiento**

Los sistemas de cruzamiento están siendo propuestos como un método para mejorar la salud y la fertilidad de los rodeos lecheros en Norteamérica. Una limitación es la pérdida de heterosis que ocurre después de la progenie F1. En un sistema rotacional con dos razas, el porcentaje de heterosis disminuye desde el 100% en la F1 al 50% en la F2 para estabilizarse al ~65% después de la F3. Si bien la heterosis puede ser mantenida en un sistema que use 3 o 4 razas, el manejo es bastante complicado. Un método para mantener la heterosis indefinidamente podría ser el uso de transferencia de embriones (in-vivo o in-vitro). Embriones producidos con ovocitos y semen de dos razas diferentes podrían ser transferidos a la F1. Con este esquema, la F1 y la progenie mantendrán un 100% de heterosis.

### **Mejoramiento de la fertilidad**

Los beneficios de la transferencia de embriones en vacas Holando en lactación durante stress calórico han sido demostrados en USA y Brasil. En un estudio realizado en Brasil (Rodrigues et al., 2004, Figura 1), la transferencia de embriones en vacas Holando en lactación aumentó la tasa de preñez en aproximadamente un 20% en los meses de verano y otoño (cuando la temperatura fue mayor a 22.5° C). La producción promedio de leche diaria durante el estudio fue de 28.4 Kg/vaca.



**Figura 1.** Diferencias en tasas de preñez entre transferencia de embriones (TE) e inseminación artificial (IA) en vacas Holando en lactación en Brasil (Adaptado de 21).

En el último congreso de la IETS en Denver, el Dr. Osamu Dochi de la Universidad Japonesa de Rakuno Gakuen, presento datos acerca del uso de la transferencia de embriones para aumentar la fertilidad en vacas o vaquillas Holando repetidoras (Dochi et al., 2008). Los animales repetidores fueron seleccionadas por veterinarios siguiendo los siguientes criterios: 1) Animales que presentaban celos normales pero ciclos estrales no siempre normales; 2) Animales que no concebían después de al menos 3 IA; 3) Animales en buen estado de salud con úteros y ovarios normales a la palpación. Los animales fueron divididos en 2 grupos; un grupo fue IA después de la detección del celo y recibió un embrión 7 u 8 días más tarde. El Segundo grupo no fue IA, solamente recibió un embrión 7 u 8 días después del celo. Los embriones fueron producidos in vitro y criopreservados en glicerol o etilen glicol. Todos los embriones fueron transferidos en el cuerno uterino contralateral al ovario conteniendo el cuerpo lúteo. Los porcentajes de preñez son presentados en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Porcentajes de preñez después de la transferencia de embriones producidos in vitro en vacas y vaquillas Holando repetidoras (Adaptado de 7).

Tratamiento	Número de transferencias	Numero de preñeces	%



<b>Vaquillona</b>	<b>Con IA</b>	<b>61</b>	<b>30</b>	<b>49.2<sup>a</sup></b>
	<b>Sin IA</b>	<b>61</b>	<b>18</b>	<b>29.5<sup>b</sup></b>
<b>Vaca</b>	<b>Con IA</b>	<b>273</b>	<b>114</b>	<b>41.5<sup>c</sup></b>
	<b>Sin IA</b>	<b>137</b>	<b>28</b>	<b>20.4<sup>d</sup></b>

<sup>ab</sup>Porcentajes dentro de la columna difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ )

<sup>cd</sup>Porcentajes dentro de la columna difieren estadísticamente ( $P < 0.01$ )

Los autores reportaron que aproximadamente el 8% de las receptoras, que fueron IA y recibieron un embrión, parieron mellizos. Una de las razones de este bajo porcentaje de mellizos se puede deber al hecho de que los embriones fueron transferidos en el cuerno contralateral a el ovario conteniendo el cuerpo lúteo.

### Investigación

La técnica de transferencia de embriones ha demostrado ser una herramienta muy útil en investigación. De hecho muchos de los adelantos técnicos en la transferencia de embriones antes de 1970 fueron dirigidos hacia la investigación más que a la propagación de animales genéticamente superiores (Beteridge, 1981; Beteridge, 2003). Esos estudios incluyen las limitaciones naturales de las gestaciones gemelares, capacidad uterina, control endócrino del medio ambiente uterino, reconocimiento materno de la preñez, interacciones embrión-endometrio, y endocrinología de la preñez. Los estudios que originalmente fueron diseñados para responder preguntas básicas de fisiología, están siendo ahora utilizados para mejorar e incrementar la implementación de la transferencia de embriones. Las nuevas técnicas agregan nuevas perspectivas con fines de investigación. La producción de gemelos idénticos, clones, quimeras, por mencionar algunas, seguramente contribuirán al avance de la ciencia. La técnica de FIV está siendo utilizada para el estudio de la capacidad fertilizante del semen, de la competencia del ovocito y el metabolismo embrionario.



## Estado actual de la técnica de transferencia de embriones

### Superovulación

El objetivo de los tratamientos superovulatorios en el bovino, es obtener el máximo número de embriones transferibles que resultaran en la mayor cantidad de terneros posibles. Desafortunadamente, la producción de embriones en animales superestimulados es muy variable. En un reporte que incluyó 2.048 vacas de carne superestimuladas, se obtuvieron un promedio de 6.2 embriones transferibles por lavado (Looney, 1986). Sin embargo, la variabilidad fue muy grande; 24% de los lavados no produjeron embriones transferibles, 64% de las donantes produjeron menos del número promedio de embriones y 30% de las donantes produjeron el 70% de los embriones transferibles. En otro estudio que incluyó 987 vacas de leche, los resultados fueron menores en cuanto al número de embriones recolectados, pero la variabilidad fue similar (Hasler et al., 1983). Estos dos estudios demuestran lo difícil que es predecir la respuesta superovulatoria, lo que afecta la rentabilidad de los programas de transferencia de embriones.

A pesar de toda la investigación llevada a cabo en los últimos años, no ha habido un mejoramiento en la cantidad promedio de embriones producidos por tratamiento superestimulador. Lo que si se ha mejorado notablemente es la producción de embriones producidos por donantes por año. Hoy en día, podemos superestimular los animales cada 30 días, sin necesidad de detectar celos y sin comprometer los resultados (Figura 2). Esto ha sido, en parte, por un mejor entendimiento de la función ovárica que ha resultado en protocolos que permiten sincronizar la onda folicular e iniciar los tratamientos superestimuladores sin la necesidad de conocer el día del ciclo estral.

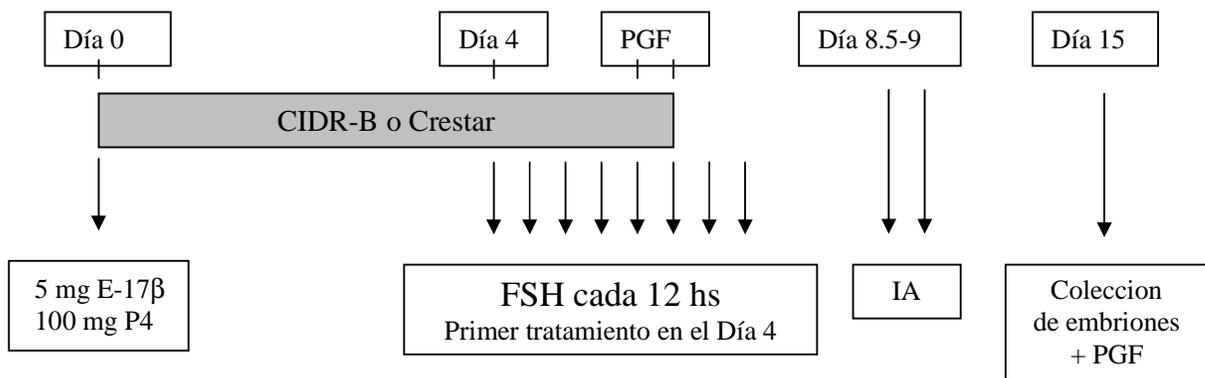
El protocolo tradicional de súperestimulación se basó originalmente en información anecdótica y experimental, en la cual se logró una mayor respuesta superovulatoria cuando los tratamientos fueron iniciados 8-12 días después del celo (Mapletoft et al., 2002). Hoy en día, gracias a la ecografía, se sabe que entre los días 8 y 12 es aproximadamente cuando comienza la segunda onda folicular.

Se ha demostrado que la presencia de un folículo dominante al inicio del tratamiento superestimulador, resulta en un 40-50% de disminución en la respuesta superovulatoria (Bungartz and Niemann, 1994; Shaw and Good, 2000; Kim et al.,



2001). Más adelante, otro estudio demostró claramente que la respuesta superovulatoria era mayor si el tratamiento superestimulador era iniciado en el momento de la emergencia de la onda folicular (Nasser et al., 1993). Un solo día de asincronía en el inicio del tratamiento, redujo significativamente la respuesta superovulatoria.

Basados en la información presentada arriba y después de años de investigación, científicos de la Universidad de Saskatchewan, desarrollaron un protocolo para sincronizar la onda folicular que permitiera iniciar los tratamientos superestimuladores en el momento más conveniente (Figura 2). Además, este protocolo, evita la necesidad de detectar celo y esperar hasta la mitad del ciclo estral para iniciar los tratamientos



**Figura 2.** Protocolo de superestimulación desarrollado en la Universidad de Saskatchewan. En el Día 0 (cualquier día del ciclo estral), las donantes son tratadas con un implante liberador de progestinas (CIDR-B o Crestar), 5 mg de estradiol-17 $\beta$  (E-17 $\beta$ ), y 100 mg de progesterona (P4). En el día 4 se inicia el tratamiento superestimulador. En el día 6 se inyecta prostaglandina (PGF; 2 tratamientos AM y PM) y se retira el dispositivo con progestina (PM). Las donantes se inseminan en los días 8 (PM) y 9 (AM; sin detectar celo). La colección de embriones es realizada en el día 15 y los animales reciben PGF después del lavado. En el día 30, se reinicia el protocolo.

Cabe mencionar que la mayoría de los veterinarios dedicados a la transferencia de embriones en Canadá usan el protocolo de superestimulación mostrado en la Figura 2. Los resultados obtenidos de programas de superestimulación tanto experimentales como comerciales (Bo et al., 2002) han demostrado que la respuesta superovulatorias de donantes tratadas con este protocolo es comparable con la respuesta de donantes tratadas con el protocolo tradicional (Tabla 5).



**Tabla 5.** Respuesta superovulatoria en el ganado bovino en el cual el tratamiento superestimulador fue iniciado en el día 8 a 12 después del celo (tradicional) o 4 días después del tratamiento con estrógeno (E2) y un dispositivo liberador de progesterona (P4) (Adaptado de 3).

	<b>Nro. de donantes</b>	<b>Nro. total de ovocitos/embriones</b>	<b>Nro. de embriones transferibles</b>
<b>Ganado de carne</b>			
<b>Tratamiento</b>			
<b>Tradicional</b>	<b>1073</b>	<b>12.8 ± 0.3</b>	<b>6.6 ± 0.2</b>
<b>E2 + P4</b>	<b>307</b>	<b>12.1 ± 0.9</b>	<b>6.3 ± 0.6</b>
<b>Ganado de leche</b>			
<b>Tratamiento</b>			
<b>Tradicional</b>	<b>254</b>	<b>8.9 ± 0.4</b>	<b>5.1 ± 0.3</b>
<b>E2 + P4</b>	<b>187</b>	<b>10.3 ± 0.5</b>	<b>6.0 ± 0.4</b>

Los promedios no fueron diferentes ( $P < 0.2$ ).

### **Criopreservación de embriones**

La congelación exitosa de embriones fue un gran avance para la industria de la transferencia de embriones. Más adelante, el uso de crioprotectores más permeables, como el etilen glicol que permite la llamada “transferencia directa” (la transferencia de un embrión sin tener que remover el crioprotector) fue un importante adelanto. De esta manera, la pajuela con el embrión es descongelada como el semen y luego el embrión es depositado en el útero de la receptora muy similar a una IA. No es necesario el uso de un microscopio o la realización de procesos complicados de dilución. Resultados recientes de la “transferencia directa” de más de 19.000 embriones bovinos en Canadá, demostraron una tasa de preñez del 58% que no difirió de la obtenida con el uso de glicerol (Leibo and Mapletoft, 1998). A pesar del adelanto en materia de criopreservación, los procedimientos dependen del uso de congeladores y microscopios que encarecen la técnica. Esto puede ser evitado con el uso de la vitrificación, un procedimiento relativamente simple (Rall and Fahy, 1985). Se utilizan altas concentraciones de crioprotectores y la pajuela con el embrión es colocada directamente en nitrógeno líquido. No se forman cristales (tan dañinos para el embrión) y la solución congelada forma un material como el vidrio, de allí el nombre de la técnica. La vitrificación tiene mucho que ofrecer en los procesos de criopreservación de ovocitos y embriones producidos in-vitro, ya que su mayor ventaja es la simplicidad. Los



procedimientos de vitrificación están siendo usados experimentalmente, y solo es cuestión de tiempo que se encuentre su aplicación comercial. Recientemente se informo de un procedimiento para la transferencia directa de embriones bovinos vitrificados, en el cual las tasas de preñez no difirieron de las reportadas por técnicas tradicionales (van Wagtendonk et al., 1996). Claramente, la vitrificación de embriones bovinos abre un nuevo horizonte en la transferencia comercial de embriones.

### **Transferencia embrionaria a tiempo fijo**

Un aspecto de la transferencia de embriones en la cual se ha avanzado es la sincronización de celos de las receptoras. Hoy en día, con el uso de dispositivos que contienen progesterina y otros tratamientos hormonales se puede eliminar por completo la detección de celos en las receptoras (Bo et al., 2002). A los 7-8 días después del supuesto celo, aquellas receptoras que poseen un cuerpo lúteo, de al menos 15-18 mm de diámetro (determinado a través de ecografía), son transferidas con un embrión.

### **Consideraciones prácticas**

Las vacas donantes deben tener un mínimo de 50 días posparto, estar ciclando normalmente, y estar en un plano de nutrición adecuado, sin tener deficiencias nutricionales específicas. Algunos recomiendan el uso de minerales traza como suplementos antes de la superovulación, y aunque aparentemente no hay datos científicos, el uso de minerales quelados es recomendable para mejorar la respuesta superovulatoria y la producción de embriones. Las donantes no deberían tener historia o evidencia física de infertilidad. Además, es importante resaltar que vacas (o hijas de vacas) con historia de superovulaciones exitosas o partos gemelares, tienen mayor posibilidad de responder bien al tratamiento.

Las vaquillas requieren de dosis menores de FSH mientras que las vacas lactando o mas viejas requieren normalmente dosis mayores de FSH. Si la respuesta superovulatoria es pobre, entonces puede ser necesario aumentar la dosis de FSH en el siguiente programa. Si la calidad embrionaria es mala en presencia de una respuesta superovulatoria alta, la dosis de FSH debería ser reducida en el próximo programa. La administración de FSH tiene que ser intramuscular profunda, se deben evitar las inyecciones subcutáneas, a



menos que se pretenda administrar una sola inyección para disminuir las situaciones de estrés.

En cuanto a las receptoras, la nutrición y el intervalo posparto son los dos factores de manejo que determinarían el éxito de un programa de transferencia de embriones. La condición corporal al momento de la transferencia es también sumamente importante. La transferencia de embriones en receptoras muy flacas u obesas resultará en bajos porcentajes de preñez.

### **Bibliografía**

- Betteridge K.J. 1981.** An historical look at embryo transfer. *Journal Reproduction Fertility*, 62: 1-13.
- Betteridge K.J. 2003.** A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Sciences*, 79: 203-244.
- Bó G.A, Baruselli P.S, Moreno D. 2002.** The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57: 53-72.
- Bondoc O.L, Smith C, Gibson J.P. 1989.** A review of breeding strategies for genetic improvement of dairy cattle in developin countries. *Animal Breed Abstract*, 57: 819-829.
- Bungartz L y Niemann H. 1994.** Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *Journal Reproduction Fertility*, 101: 583-591.
- Christensen L.G. 1991.** Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*, 35: 141-156.
- Dochi O, Takahashi K, Hirai T. 2008.** The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology*, 69: 124-128.
- Gibson J.P y Smith C. 1989.** The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies. In: Babiuk LA, ed. *Comprehensive Biotechnology*, First Ed. New York: Pergammon Press; 203-231.
- Hasler J.F, McCauley A.D, Schermerhorn E.C. 1983.** Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19: 83-99.
- Hasler J.F. 1998.** The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal Animal Sciences*, 76 (Suppl. 3): 52-74.
- Hasler J.F. 2003.** The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Sciences*, 79: 245-264.
- Hasler J.F, Hurtgen P.G, Jin Z.Q. 1997.** Survival of IVF-derived emrbyos frozen in glicerol or ethylene glycol. *Theriogenology*, 48: 563-579.
- IETS Data retrieval committee report **2006.** *Embryo Transfer Newsletter*, 2007; 15-20.
- Kim H.I, Son D.S, Yeon H. 2001.** Effect of dominant follicle removal before supestimulacion on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 55: 937-945.



- Leibo S.P y Mapletoft R.J. 1998.** Direct transfer of cryopreserved cattle embryos by freezing. Proceeding Annual Meeting AETA, San Antonio, TX, 91-98.
- Lohuis M.M. 1995.** Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*, 43: 51-60.
- Looney C.R. 1986.** Superovulation in beef females. In: Proc 5<sup>th</sup> Annual Convention AETA, Fort Worth, Texas; 16-29.
- Mapletoft R.J. 1987.** Technology of embryo transfer. Proc XXXIII World Veterinary Congress, Montreal, PQ, 2-40.
- Mapletoft R.J, Steward K.B, Adams G.P. 2002.** Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42: 1-11.
- Nasser L.F, Adamas G.P, Bo G.A. 1993.** Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40: 713-724.
- Rodrigues C.A, Ayres H, Reis E.L. 2004.** Artificial insemination and embryo transfer pregnancy rates in high production Holstein breedings under tropical conditions. Proceeding 15<sup>th</sup> Congress on Animal Reproduction, 2: 396.
- Rall W.F y Fahy G.M. 1985.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
- Ruane J y Smith C. 1989.** The genetic response possible in dairy cattle improvement by setting up a multiple ovulation and embryo transfer (MOET) nucleus scheme. *Genetic Selection Evaluation*, 21: 169-183.
- Seidel G.E Jr. 1981.** Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*, 211: 351-358.
- Shaw D.W y Good T.E. 2000.** Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 53: 1521-1528.
- Singh E.L. 1998.** Disease control: procedures for handling embryos. Review Science Technology Office International Epizooties, 4: 867-872.
- Smith C. 1988.** Applications of embryo transfer in animal breedings. *Theriogenology*; 29: 203-212.
- Smith C. 1988.** Genetic improvement of livestock using nucleus breeding units. *World Animal Review*, 65: 2-10.
- Smith C y Ruane J. 1987.** Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial review in dairy cattle. *Canadian Journal Animal Sciences*, 67: 985-990.
- Stringfellow D.A. 1998.** Recommendations for the sanitary handling of in-vivo-derived embryos. In: Stringfellow D.A and Seidel S.M eds. Manual for the International Embryo Transfer Society. 3<sup>rd</sup> edition. Savoy, IL, 79-84.
- Stringfellow D.A y Givens M.D. 2000.** Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. *Animal Production Sciences*, 60-61: 629-642.
- Stringfellow D.A, Givens M.D, Waldrop J.G. 2004.** Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reproduction Fertility Development*, 16: 93-102.
- Teepker G, Keller D.S. 1989.** Selection of sires originating from a nucleus breeding unit for use in a commercial dairy population. *Canadian Journal Animal Sciences*, 69: 595-604.



Ciencia Veterinaria  
Volumen 9 - Número 1 - 2007  
**General Pico - La Pampa, República Argentina**  
**ISSN: 1515-1883**

**van Wagtendonk A.M, den Daas J.H.G, Rall W.F. 1996.** Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48: 1071-1084.

**Wrathall A.E, Simmons H.A, Bowles D.J, Jones S. 2004.** Biosecurity strategies for conserving valuable livestock genetic resources. *Reproduction Fertility Development*, 16: 103-112.

**Xu J, Guo Z, Su L. 2006.** Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *Journal Dairy Science*, 89: 2510-2518.