

DESARROLLO EMBRIONARIO Y ESTRATEGIAS ANTILUTEOLITICAS HORMONALES EN PROGRAMAS DE TRANSPLANTE DE EMBRIONES BOVINOS

EMBRYONIC DEVELOPMENT AND HORMONAL ANTILUTEOLYTIC STRATEGIES FOR EMBRYO TRANSFER PROGRAMS IN CATTLE

Néstor Tovío L,* M.Sc, Arturo Duica A, M.Sc, Henry Grajales L, Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Grupo de investigación en Fisiología de la Reproducción. Bogotá, Colombia. *Correspondencia: nitoviol@unal.edu.co

Recibido: Febrero 2 de 2007; Aceptado: Enero 10 de 2008

RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario se establecen múltiples interacciones entre hormonas, factores de crecimiento (FC) y diferente tipo de moléculas, con lo cual se genera una serie de señales que desencadenan el reconocimiento materno de preñez (RMP) entre los días 15 y 17, momento en el cual se genera un "periodo crítico", cuando el endometrio libera la hormona prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) para causar regresión del cuerpo lúteo (CL), en el cual se sintetiza progesterona (P_4), hormona encargada de favorecer un adecuado ambiente uterino para el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez. El embrión en desarrollo genera señales antiluteolíticas que bloquean la producción de la $PGF_{2\alpha}$, por lo que se podría sugerir que el mantenimiento de la preñez es dependiente de la efectividad de este bloqueo, entre otros factores; el cual es generado por la acción del Interferón τ ($IFN-\tau$), producido en las células mononucleares del trofoblasto embrionario. Este bloqueo garantiza la integridad del CL y de esta forma la producción normal de P_4 . Por lo anterior se podría pensar que la manipulación estratégica apoyada hormonalmente, mejora las condiciones para el efectivo bloqueo de los agentes luteolíticos que tienen su mayor actividad durante el llamado "periodo crítico", con lo cual se mejora la tasa de sobrevivencia en programas de transplante embrionario ya que se crearía un ambiente uterino adecuado para el establecimiento y normal desarrollo del embrión. Por esto mismo, últimamente se han planteado mecanismos de apoyo hormonal que causan un bloqueo apropiado en cuanto a la producción de $PGF_{2\alpha}$ uterina durante los días 15 y 17 del ciclo estral.

Palabras clave: Mortalidad, embrión, trofoblasto, interferón τ , progesterona, prostaglandina $F_{2\alpha}$.

ABSTRACT

During embryonic development multiple interactions are established between hormones, growth factors (GF) and different type of molecules, generating a series of signals that unchain the maternal recognition of pregnancy (MRP) between days 15 and 17. During this "critical period", the endometrium liberates the hormone prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) to cause luteolysis of the corpus luteum (CL), which synthesizes progesterone (P_4), which, in turn, favors the production of endometrial secretions necessary for the successful establishment and development of the embryo and maintenance of pregnancy. The developing embryo generates antiluteolytic signals that block the production of $PGF_{2\alpha}$, suggesting that the maintenance of pregnancy is dependent upon (among other factors) the effectiveness of this blocking. The blocking is generated by the action of Interferon *tau* (IFN- τ), produced in mononuclear cells of the embryonic trophoblast. This blocking guarantees the integrity of the CL and thereby the normal production of P_4 . The foregoing suggests that hormonally supported strategic manipulation improves the effective blocking of luteolytic agents that have their greatest activity during the "critical period". This improves the survival rate in embryonic transplant programs by creating a uterine environment adequate for the establishment and normal development of the embryo. Mechanisms of hormonal support have been proposed that would result in blocking of the production of uterine $PGF_{2\alpha}$ during the critical period between days 15 and 17 of the estrus cycle.

Key words: Embryo, mortality, trophoblast, interferon *tau*, progesterone, prostaglandin $F_{2\alpha}$.

INTRODUCCIÓN

La interacción entre varios factores es determinante en el proceso de desarrollo y de implantación embrionaria. Desde el estadio de ovocito, se observa en el líquido oviductal sustancias como piruvato, bicarbonato, aminoácidos libres, oxígeno, CO_2 , carbohidratos, lípidos, esteroides y factores de crecimiento, que son aportadas entre otros por la mucosa del oviducto que en interacción con otras producidas por el mismo ovocito participan en su mantenimiento (1).

Llevada a cabo la fertilización, se observa que las secreciones hormonales específicas interactúan con determinados factores para desencadenar el desarrollo del embrión. Especialmente se destaca la Progesterona (P_4), hormona secretada por el cuerpo lúteo (CL) el cual tiene una duración activa y prolongada, rasgo característico de la preñez en los mamíferos (2).

La P_4 actúa en el útero estimulando y manteniendo las funciones necesarias para

el desarrollo embrionario temprano, esto con la finalidad de llevar a cabo la implantación, placentación y desarrollo fetal. De acuerdo a esto se ha afirmado que el control endocrino para la síntesis de proteínas uterinas durante el desarrollo embrionario temprano está influenciado principalmente por la acción de la P_4 , la cual es la responsable de los cambios cualitativos y cuantitativos en el medio ambiente uterino, controlando la síntesis y secreción de por lo menos 10 proteínas (2). Según esto se asume que deficiencias de P_4 podrían causar que el endometrio llegue a ser deficiente en cuanto a la nutrición histotrófica, fuente disponible para el crecimiento, mantenimiento y supervivencia del *conceptus* (embrión con todas sus membranas asociadas) (1, 2). Estas deficiencias de origen endocrino estarían contribuyendo a aumentar los niveles basales de mortalidad embrionaria (ME), niveles que probablemente se deban a una selección natural ineludible, la cual busca con este mecanismo la eliminación de genotipos poco competentes (3).

Se han podido detectar pérdidas embrionarias entre el 25 y 40% durante los primeros días de gestación en hembras receptoras de embriones bovinos (4). Se observa que la mayoría de estas hembras retornan a celo en la fecha prevista, a los 20 – 22 días, manifestando un ciclo sexual normal y completo (vacas repetidoras) (5), por lo que se podría sugerir que la ME se originó entre los días 7 y 17; es decir, el periodo comprendido entre el trasplante embrionario y el reconocimiento materno de la preñez (RMP) (6). En cuanto a las pérdidas embrionarias que suceden entre el día 28 y 98 (cuando ya ha ocurrido el RMP) se han calculado porcentajes del 7 al 33 % (3).

De acuerdo con lo anterior se sugiere que durante el establecimiento de la preñez se presenta un "periodo crítico" muy definido entre los días 15 y 17 (4). Se puede decir que la biología durante de este periodo es multifactorial y compleja, en donde el endometrio podría recibir una señal antiluteolítica poco adecuada que no cause bloqueo en la producción de $PGF_{2\alpha}$ endometrial, lo que desencadena en la lisis del CL (el mantenimiento de la preñez es dependiente de la funcionalidad del CL). Esta señal es generada en las células del trofoblasto embrionario las cuales secretan el factor antiluteolítico conocido como interferón *tau* (IFN- τ) (4, 6, 7).

Indudablemente existen otros factores endocrinológicos, celulares y moleculares que determinan el mantenimiento o nó de la preñez, pero aún no han sido plenamente aclarados (2).

Conocida la influencia de la P_4 en determinados eventos relacionados con el mantenimiento de la preñez, desde estadios tempranos y la influencia de la $PGF_{2\alpha}$ para causar luteólisis, se han propuesto y desarrollado una serie de estrategias hormonales con la finalidad de mantener la preñez (6). Estas se basan en hacer eficiente la capacidad secretora de P_4 por parte del CL, y que esta secreción ocurra en el momento oportuno, garantizando de esta manera un ambiente uterino adecuado para el embrión transplantado a hembras receptoras de embriones bovinos; para así incrementar la tasa de preñez en los

programas de trasplante embrionario (8).

El objetivo de esta revisión es identificar algunos de los factores relacionados con el desarrollo embrionario y el reconocimiento materno de la preñez en bovinos; asimismo, reconocer el uso de algunos mecanismos de apoyo hormonal principalmente con Gonadotropina Corionica Equina (eCG) que puedan determinar el desencadenamiento de señales luteotrópicas necesarias para el reconocimiento y mantenimiento de la preñez en hembras receptoras bovinas con embrión transplantado.

FACTORES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Los factores que comprometen el desarrollo embrionario y el subsiguiente crecimiento fetal son complejos ya que involucra procesos como la proliferación celular, el desarrollo y mantenimiento del CL, las funciones del oviducto y del útero, la implantación y vascularización del embrión entre otros (9).

Durante los primeros estadios de división celular desde una célula hasta el blastocisto temprano alrededor del día 7 - 8, el embrión se encuentra encerrado en la zona pelúcida, donde sus requerimientos para mantenimiento se basan en el piruvato y oxalacetato (10). En estas primeras etapas antes de la fertilización, se ha evidenciado la presencia de factores de crecimiento (FC) como el transformador alfa (TGF- α), el transformador beta (TGF- β) y el derivado de plaquetas (PDGF), lo cual sugiere que están involucrados en el proceso de desarrollo temprano del ovocito (8, 11).

Entre 3 y 4 días posteriores a la fertilización (fase de 8 a 16 células), el embrión migra del oviducto hacia el cuerno uterino en donde la glucosa es utilizada como sustrato energético (9). El FC similar a la insulina tipo 1 (IGF-I) podría estar involucrado en este proceso de descenso embrionario, ya que el ARNm que codifica para IGF-I ha sido encontrado en el oviducto bovino durante esta fase de migración (12).

A los 5 ó 6 días de vida embrionaria (fase de 16 a 32 células), se lleva a cabo el proceso de compactación celular, formándose contactos que desarrollan uniones firmes entre las células (8). En esta etapa el embrión comienza a funcionar como un organismo llamado mórula, el cual es relativamente independiente del ambiente uterino y su supervivencia parece depender de su programación genética (10). Durante este estadio se expresan las anomalías cromosómicas procedentes del padre, lo que podría desencadenar en ME (13).

El desarrollo de uniones intracelulares estrechas en el estadio de mórula durante la compactación, es seguido de la acumulación de líquido formando una cavidad central que recibe el nombre de blastocelo, la cual también acumula líquido proveniente del metabolismo mitocondrial (10).

La localización de la bomba sodio-potasio (Na^+/K^+) activa en la membrana basal del trofoblasto para transporte iónico activo, esto establece un gradiente que induce movimiento de líquido hacia adentro del blastocelo, provocando expansión que hace que las células de la mórula compactada se ubiquen hacia la zona externa o interna de las vesículas llenas de líquido, con lo cual se forma una capa celular externa que recibe el nombre de trofoblasto y una masa celular interna llamada embrioblasto, originándose de esta manera el estadio de blastocisto (11); el cual alrededor de los 8 días de vida posee aproximadamente 120 células asociadas con la masa celular interna (embrioblasto) (25%) y el trofoblasto (75%) (1,3).

Aproximadamente al 9º o 10º día de vida (fase de 160 células) el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida por combinación de acciones físicas y enzimáticas de la vesícula en expansión (13). Esta liberación podría estar involucrando síntesis de prostaglandinas por parte del embrión ya que la P_4 estaría evitando la expansión y liberación del blastocisto (9). Las enzimas plasmina y tripsina activan al blastocisto lo cual causa reblandecimiento de su zona matriz permitiendo la expansión y ruptura a lo largo del plano ecuatorial para la salida de la masa celular (1). Inmediatamente, se establece

el primer contacto del embrión y el epitelio uterino materno, lo cual desencadena un intercambio de nutrientes y prepara el ambiente para un estado de preimplantación embrionaria (9). Tras la liberación el embrión comienza a cubrir físicamente parte del endometrio para poder comenzar a regular la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina la cual cumple funciones de luteólisis (14).

El estado de preimplantación embrionaria *in vivo*, estaría regulado por factores de crecimiento de origen materno y embrionario, como el $\text{TGF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta 1$, $\text{PDGF-}\alpha$, IGF-I , IGF-II , $\text{TGF-}\beta 2$, $\text{TGF-}\beta 3$, CSF-1 , Interleucina 3 (IL-3) e IL-6 ; además citoquinas como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (15, 16).

La regulación de la receptividad del útero a la implantación del blastocisto, podría estar ejercida por una glucoproteína transmembranosa denominada Muc-1 . Esta es abundante en la fase no receptiva y se reduce notablemente o puede estar ausente para el momento de la implantación (11). Como la síntesis epitelial de Muc-1 esta regulada por la P_4 , la pérdida de receptores nucleares para esta hormona del epitelio uterino (día 8 – 10) reduciría la producción de Muc-1 y se abriría un estado receptivo para la adhesión del embrión. Para el día 10 se reduce la producción de la P_4 , lo que conlleva igualmente a la reducción de la concentración de Muc-1 (13). Esta reducción permite la interacción y contacto entre factores adhesivos como las integrinas y sus receptores, acercando el embrión a la superficie uterina y formando un tipo de placentación epiteliochorial (17).

Jonson et al (18) reportan la expresión de integrinas en rumiantes, las cuales son secretadas por las glándulas endometriales y detectadas a lo largo de la superficie del lumen uterino hacia los días 19 a 21 de preñez (periodo temprano de adhesión con puntos visibles entre carúnculas y cotiledones) (13).

Se sugiere que la $\alpha\beta 3$ es una de las más versátiles integrinas capaz de vincular proteínas como la fibronectina, fibronectina oncofetal, vitronectina, tenascina y osteopontin de la cual se reporta que el epitelio glandular de ovejas preñadas expresa

su mRNA (18). También se ha observado que la expresión endometrial de esta proteína es regulada por la P_4 y no por el IFN- τ (19). En vacas se reporta específicamente la expresión de sub unidades de integrinas $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\alpha v \beta 3$ (20).

Otra molécula vinculada a la adhesión embrionaria, es la 1- like (GlyCAM - 1 like), la cual ha sido detectada en vacas preñadas, encontrado sus máximas concentraciones hacia el día 15 y 17 de gestación (21).

Se ha observado durante el fenómeno de adhesión del embrión bovino y ovino el desarrollo de microvellosidades, las cuales son proyectadas hacia el interior de la luz de las glándulas uterinas (18). Estas vellosidades proporcionan un anclaje transitorio y una estructura absorbente para el embrión mientras sigue completándose la implantación. Posteriormente estas microvellosidades se reducen en longitud lo que conlleva a un contacto mas cercano entre estas y el epitelio uterino, el cual termina comprimiéndose hacia la superficie trofoblástica interbloqueándose con las proyecciones citoplásmicas en la superficie del trofoblasto hasta que sus microvellosidades vuelven a desarrollarse, de esta forma generando una adhesión compleja (17).

Para el día 42 de vida termina el período embrionario al completarse el periodo de diferenciación, evidenciándose el feto en el cual mayoría de los tejidos, sistemas y órganos se encuentran ya formados (13).

ASPECTOS RELACIONADOS CON EL RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ

El RMP se define como el periodo crítico en el cual el *conceptus* da señales de su presencia a la madre (2). Este reconocimiento requiere que el *conceptus* se transforme de esférico hacia una forma elongada para generar una mayor superficie de contacto (precontacto) con el epitelio uterino, con la finalidad de desencadenar la producción del factor antiluteolítico IFN- τ ;

producción regida entre otros por el estado de desarrollo embrionario (6). Este interferón es producido en las células mononucleares del trofoblasto embrionario entre los días 10 y 21, con producción máxima alrededor de los días 14 y 19 de gestación, tiempo en el cual el embrión se encuentra en estado de precontacto (7).

La síntesis y secreción de IFN- τ se relaciona con la presencia en el fluido luminal uterino del FC IGF- I y IGF-II. La presencia de un solo FC no afectaría la presencia de interferón, sin embargo ambos factores podrían aumentar significativamente su secreción, lo que podría indicar un papel importante para los FC similares a la insulina en el RMP (3). Su localización en donde comienza a establecer efecto antiluteolítico es a nivel de la región intercaruncular, en donde las células responden mas a concentraciones de oxitocina (OT) (17).

De acuerdo con la clasificación de la sociedad internacional de interferones, estos son glucoproteínas sintetizadas durante la respuesta inmunitaria, así como bajo influencia de múltiples estímulos antigénicos o mitógenos; igualmente poseen propiedades antivíricas y antiproliferativas. El IFN- τ se clasifica como una proteína ácida con peso molecular de 19 kDa, y es el primer interferón clasificado en la familia tipo I cuyas propiedades no solamente son antivíricas y es expresado por una familia de genes que está restringida a especies de rumiantes como vacas, ovejas y cabras (22).

Durante la fase lútea la P_4 tiene una doble función en la regulación de la expresión de receptores para la OT en el útero, induciendo la presencia de altos niveles de receptores para P_4 en el endometrio (modulación en alta), con lo cual se inhibe la expresión de los receptores para estrógenos (RE) y para oxitocina (ROT), fenómeno que se conoce como el "bloqueo de la P_4 " (17). No obstante, la misma P_4 comienza a ejercer gradualmente una regulación para la disminución de la expresión de sus propios receptores (modulación baja) en el epitelio luminal, perdiendo así su habilidad para suprimir la expresión endometrial de los RE y ROT, por lo cual en el caso de existir preñez el embrión debe extender el "bloqueo de la P_4 ",

previniendo así la producción pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediante la secreción de $\text{IFN-}\tau$ (factor luteotrópico) (23). Este efecto antiluteolítico del $\text{IFN-}\tau$, resulta en el mantenimiento estructural y funcional del CL, por lo tanto se asegura la secreción de P_4 que es esencial para mantener un ambiente uterino que soporte los acontecimientos críticos para el desarrollo exitoso del *conceptus* (24).

Señal luteolítica. La vaca ovula espontáneamente, lo cual es dependiente del ciclo estral que es repetitivo de acuerdo a su duración hasta el establecimiento de la preñez (25). Por tal razón se podría decir que el ciclo estral es dependiente de la acción del endometrio (epitelio luminal y glandular superficial), si se tiene en cuenta que este es la fuente del factor antiluteal ($\text{PGF}_{2\alpha}$) cuando la vaca no se encuentra preñada o cuando no se reconoce su preñez (26).

Durante el diestro temprano, la síntesis de P_4 producida por el CL recién formado comienza a disponer el útero para el establecimiento de la preñez, pero igualmente activa mecanismos determinantes para la producción endometrial del factor luteolítico (3).

Hacia los días 10 y 15 del ciclo estral, cuando comienza a disminuir el número de receptores de P_4 en el útero (modulación baja), comienzan a aumentar los RE endometriales los cuales inducen la expresión de ROT (19). Los E_2 provienen de los folículos en crecimiento y estimulan el aumento de sus receptores alfa. La OT proviene de las células luteales grandes; igualmente es producida en el hipotálamo y almacenada en la neurohipófisis (25).

En la célula endometrial la unión de la OT con su receptor estimula el clivaje de ácido araquidónico a partir de la fosfolipasa C (PLC), la cual activa la fosfolipasa A2 (PLA_2) (17). Intervienen para este fin mensajeros como el inositol trifosfato (IP_3) y el diacylglicerol (DAG) (sistema de segundo mensajero fosfatidil – inositol – diacylglicerol – proteína kinasa C) (3). El IP_3 estimula la

liberación de Ca^{++} de las reservas intracelulares (17). El DAG activa la proteína Kinasa C (PKC) la cual estimula a la PLA_2 en presencia de Ca^{++} para que posteriormente se induzca la liberación de ácido araquidónico de los depósitos fosfolípidicos en el epitelio endometrial (la P_4 en etapas tempranas de CE induce incremento en las reservas de fosfolípidos) (27).

La transformación del ácido araquidónico en $\text{PGF}_{2\alpha'}$ es regulada por la isoforma cox 2 de la prostaglandina sintetasa, enzima identificada en el epitelio luminal de vacas preñadas (17). La actividad de esta enzima se incrementa durante el diestro temprano por acción de la P_4 la cual es inducida por el estradiol, factores de crecimiento e interleuquinas, (1, 3, 15). La concentración de cox 2 se reduce cuando el $\text{IFN-}\tau$ comienza a ser secretado por parte de las células del trofoblasto embrionario (24).

Al final de cada ciclo estral hacia el día 16 - 17 el CL sufre luteólisis por la acción de la $\text{PGF}_{2\alpha'}$ la cual es producida por el epitelio endometrial y vertida a la vena uterina, de donde por difusión pasa a la arteria ovárica y por contracorriente alcanza al cuerpo lúteo en donde se une a receptores ubicados en las células luteales (25). Allí por eventos intracelulares se desencadena la muerte de las células por apoptosis (22).

Se sugiere que para que se produzca luteólisis, el cuerpo lúteo debe ser expuesto aproximadamente de 5 a 8 pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con intervalos de 6 a 8 horas. Esta pulsatilidad ocurre en respuesta a la unión de la OT con su receptor en las células del endometrio uterino (3).

Señal luteotrópica. La formación del CL activa la síntesis y secreción de P_4 por parte de esta glándula endocrina transitoria, con ello se incrementan sus receptores en el útero hacia los primeros días del diestro (regulación en alta), lo que desencadena el bloqueo de la expresión del gen para RE, asimismo se previene que los estrógenos incrementen la expresión de genes para ROT (3,28).

Hacia el final de la mitad de la fase luteal del CE los receptores de P_4 en el útero comienzan a disminuir (regulación en baja), desencadenando un incremento en la expresión de RE y ROT, con lo cual se desencadenan los factores necesarios para causar luteolisis, evidenciándose un nuevo ciclo estral en el caso de no existir preñez (28).

El IFN- τ producido por las células mononucleares del trofoblasto embrionario, actúa de forma parácrina ligándose a sus receptores en las células endometriales, lo que desencadena el bloqueo de la expresión de ARNm que codifica para la expresión del gen de receptores alfa de E2 (RE) y la expresión del gen para ROT, impidiendo de esta forma el desencadenamiento del mecanismo endometrial luteolítico. Sin embargo el interferón no inhibe la producción basal de la $PGF_{2\alpha}$ (29).

Algunos autores sugieren que al ligarse el IFN- τ a su receptor de membrana, induce la vía de transcripción citoplasmática (STAT), proteína que fosforilada forma un complejo que migra al núcleo, allí se une a la región reguladora de los genes inductores del interferón que podrían estar bloqueando uno o mas pasos de la vía de síntesis de la prostaglandina (29). Igualmente se ha propuesto que el IFN- τ también ejerce un efecto antiluteolítico incrementando los niveles de ácido linoléico, el cual inhibe por competencia de cox 2 al ácido araquidónico, con lo cual la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ se ve afectada (3).

En el mecanismo antiluteolítico se sugiere que participan además del IFN- τ la prostaglandina E_2 la cual ejercería protección del CL, el factor activador de las plaquetas (FAP), este último posiblemente en sinergismo con el interferón y quizás otras proteínas de origen trofoblástico entre otros (29).

Básicamente el RMP está regulado por la capacidad del endometrio en responder a las señales generadas por el embrión, lo que desencadena el bloqueo en la producción de $PGF_{2\alpha}$. Este bloqueo depende básicamente de la elongación del *conceptus* el cual debe cubrir una adecuada cantidad del cuerno uterino para comenzar a generar la síntesis

de IFN- τ (30). Teniendo en cuenta lo anterior se ha evidenciado que el *conceptus* bovino varía de tamaño que va de 15 a 250 mm. para el día 17, con lo cual se resalta la importancia del desarrollo embrionario que es regulado en gran parte por interacciones guiadas por la P_4 (6).

Estrategias antiluteolíticas. La naturaleza crítica alrededor del periodo de reconocimiento, aposición y adhesión del embrión al endometrio uterino durante la implantación, determina la necesidad de un estricto sincronismo entre el embrión transplantado y su receptora, enfatizando la importancia tanto del medio uterino como de las señales del *conceptus* que dan lugar al RMP (6), señales que deben ser emitidas en el momento y concentración precisa, de tal manera que se garantice el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del CL, que genere una continua producción de P_4 para el mantenimiento un ambiente uterino que apoye el normal desarrollo del *conceptus* (31).

La hembra debe ajustar sus propiedades fisiológicas dependiendo de si está o no preñada, si lo está debe generarse un bloqueo efectivo antiluteolítico el cual depende de la habilidad del *conceptus* en enviar señales para que el endometrio uterino responda a ese bloqueo en la producción de $PGF_{2\alpha}$ (27).

La comunicación entre el *conceptus* y el útero, no siempre tiene éxito, lo que desencadena grandes pérdidas embrionarias (6). Por eso mismo se plantean estrategias que buscan minimizar el efecto luteolítico, el cual desencadena la pérdida temprana del embrión, acontecimiento más fácilmente evidenciado en los programas de transplante embrionario, ya que con estos se asegura la presencia del embrión vivo y de buena calidad desde el día 6 a 8 momentos en el cual este es transplantado (32).

La relación entre la tasa de preñez y la concentración plasmática de P_4 de acuerdo al tamaño del CL en receptoras de embriones

bovinos, ha sido objeto de controversia en varios estudios realizados. Algunos investigadores han verificado la correlación positiva entre estas variables, encontrando que a mayor área del CL mayor es la concentración de P_4 plasmática, y consecuentemente mayor es la tasa de preñez (27, 32-35). Con estos resultados se podría evidenciar que los incrementos en la concentración de P_4 durante el "periodo crítico" estimula la secreción de los agentes antiluteolíticos con lo cual se hace eficiente el RMP (34).

Contrariamente autores como Spell et al (36), no han encontrado correlación entre las variables tamaño del CL, concentración de P_4 plasmática y porcentaje de preñez en hembras receptoras con embrión transplantado.

En varios estudios realizados el aumento en concentraciones plasmáticas de P_4 durante el diestro ha sido correlacionado con la capacidad del embrión en secretar IFN- τ , provocando así aumento en las tasas de preñez (27, 37), pero en otros reportes no se ha observado esta relación y efecto (38).

Kerbler et al (39), encontraron una correlación positiva entre la concentración de P_4 plasmática y la síntesis de IFN- τ producido por embriones de 18 días de edad, en donde se halló la concentración de interferón utilizando la prueba antiviral con virus de estomatitis vesicular. Según estos resultados se podría sugerir que a mayor concentración de P_4 plasmática en hembras preñadas mejor será el ambiente uterino para el *conceptus* en vías de desarrollo (40). Esto se entiende si se tiene en cuenta que la P_4 es la precursora de los diferentes componentes que conforman este ambiente. Cualquier variación en la concentración de P_4 es determinante en la modulación de la expresión y secreción de factores de crecimiento, citoquinas y proteínas, que condicionan el medio uterino para los procesos de receptividad endometrial y de viabilidad embrionaria (39).

De acuerdo con lo anterior se podría sugerir que al brindar fuentes directas o indirectas de P_4 a hembras durante los primeros días de preñez el porcentaje de pérdidas

embrionarias disminuiría, ya que se mejoraría el ambiente uterino en donde el *conceptus* tendrá un desarrollo adecuado, evidenciando mejor síntesis y secreción de IFN- τ , pues esta secreción está influenciada por el estado de desarrollo embrionario (39).

Con la finalidad de aumentar la tasa de preñez se han utilizado terapias de apoyo hormonal en hembras receptoras de embriones bovinos, utilizado Gonadotropina Corionica Equina (eCG) en protocolos de transplante de embriones a tiempo fijo (TETF) (32).

La eCG es una hormona con promedio de vida de 3 días, producida por los cálices endometriales en la yegua preñada entre los días 40 a 130 (41). Esta hormona se vincula a los receptores foliculares de FSH y de LH, y a los receptores de LH del CL, creando de esta forma condiciones de crecimiento folicular, ovulación y luteinización (41, 42).

La aplicación de eCG en el momento esperado de una nueva onda de crecimiento folicular, ha demostrado eficiencia en cuanto a superovulación y/o desarrollo de un folículo dominante de mayor diámetro, determinando de esta forma un mayor número de cuerpos lúteos o un CL de buen tamaño (32). Esto va acompañado de mayores concentraciones plasmáticas de P_4 y mejores tasas de aprovechamiento, concepción y de preñez frente a tratamientos sin aplicación de esta hormona (32, 43, 44).

Investigaciones realizadas por Melanie et al (45), no reportaron diferencia entre la concentración plasmática de P_4 y la cantidad de cuerpos lúteos presentes en hembras preñadas, por el contrario encontraron mayor pérdida de preñeces en las hembras con doble ovulación, lo que sugiere que demasiada P_4 plasmática podría estar alterando el balance hormonal uterino perjudicando el ambiente para el embrión en desarrollo.

Nasser et al (46), han verificado que con la aplicación de eCG el día 8 de sincronización, determina apenas un 2% de doble ovulación en receptoras de embriones, pero evidenciaron que con la aplicación de esta hormona se consiguen cuerpos lúteos únicos de mayor tamaño, incrementando así la tasa de preñez. Igualmente Quezada y Ortiz (47),

encontraron que con la aplicación de la eCG el día 8 se mejora la tasa de aprovechamiento, sin embargo no encontraron que esta hormona mejore el área del CL.

En un estudio realizado recientemente por Mamani et al (48) de acuerdo con la dosificación de la eCG, no se reporta diferencia de la tasa de aprovechamiento y tasa de preñez con la utilización de diferentes dosis de eCG (200, 300 y 400 UI) en hembras receptoras cruzadas *Bos Indicus X Bos Taurus*.

Igualmente se han realizado estudios utilizando eCG en donde se ha observado el incremento en las tasas de preñez en programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en hembras en estado de anestro (41, 49). Con la finalidad de incrementar la P₄ plasmática en búfalas y vacas, se han utilizado tratamientos con GnRH, LH, hCG y dispositivos de liberación lenta de P₄ aplicados el día 7 del ciclo estral (30, 50).

Igualmente la hCG se ha aplicado en tratamientos de sincronización el día 6, obteniéndose tasas de preñez más altas frente a grupos sin la aplicación de esta

hormona. Estos resultados igualmente sugieren que la hCG dependiendo del día de su aplicación induce la ovulación y la formación de cuerpos lúteos accesorios, los cuales incrementan la concentración de P₄ plasmática y la tasa de preñez en hembras receptoras de embriones bovinos (41).

CONCLUSIÓN

La interrelación activa y adecuada de varios factores son los que determinan el establecimiento y desarrollo embrionario, con lo cual se establecen mecanismos bioquímicos que desencadenan una señal antiluteolítica basada en el reconocimiento materno de la preñez (RMP). Cualquier falla en los factores determinantes desencadena la muerte del embrión. Con respecto a lo anterior, se han desarrollado terapias específicas con las cuales se mejora el ambiente uterino con la finalidad de incrementar los porcentajes de preñez con embriones transplantados a receptoras bovinas, siendo la terapia con la utilización de Gonadotropina Corionica Equina (eCG) la más investigada en los últimos años.

REFERENCIAS

- 1 Neider G, Corder C. Qualitative histochemical measurement of pyruvate and lactate in the mouse oviduct during the estrus cycle. *J Histochem Cytochem* 1982; (30): 1051.
- 2 Spencer T, Burghardt R, Johnson G, Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 2004; 839: 537– 550.
- 3 Rodríguez J. Mecanismos para el reconocimiento materno de la preñez. En: *Reproducción Bovina*. Editor González C. Maracaibo – Venezuela: Ed. Fundación GIRARZ; 2001.
- 4 Santos J, Thatcher W, Chebel R, Cerri R, Galvão K. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 2004; (83): 513–535.
- 5 Sreenan J, Diskin M. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec* 1982; (112): 517-521.
- 6 Binelli M, Thatcher W, Mattos R, Baruselli P. Antiluteolytic Strategies to Improve Fertility in Cattle. *Theriogenology* 2001; (56): 1451–1463.
- 7 Dailey RA, Inskeep EK, Lewis PL. Pregnancy failures in cattle: a perspective on embryo loss. In: *Proceedings of the XVIIIth International Conference on Reproduction of Farm Animals*, Slovakia; 2002.

- 8 Thatcher W, Guzeloglu A, Binelli M, Hansed TR, Pru JK. Uterine conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 2001; (56): 1435–1450.
- 9 Thatcher W, Bartol F, Knickerbocker J, Curl J, Wolfenson D, Bazer F. Maternal recognition of pregnancy in cattle. *Dairy Sci* 1984; 67: 2797–2811.
- 10 Araújo M, Vale V, Ferreira A, Sá W, Barreto J, Filho L. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados. Interferon *tau* secretion in cattle embryos in vitro fertilized before and after cryopreservation. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2005; (57): 751-756.
- 11 Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GS. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 1992; (31): 87-95.
- 12 Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and IGF-I is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 1997; 48: 605-616.
- 13 Johnson, M. Intrinsic and extrinsic factors in preimplantation development *Reprod Fert* 1979; 55: 255.
- 14 Kaplan JH. Biochemistry of K.ATPase. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 511–535.
- 15 Peña M, Góngora A, Estrada J. Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *Rev MVZ Córdoba* 2007; 12(1): 942–954.
- 16 O´neill C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. *Molec Reprod Dev* 1998; 58: 1303–1309.
- 17 Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T. Trophoblast interferons. *Placenta* 1999; 20: 259–264.
- 18 Johnson GA, Burghardt RC, Spencer TE, Newton GR, Ott TL, Bazer FW. Ovine osteopontin II. Osteopontin and $\alpha v \beta 3$ integrin expression in the ovine uterus and conceptus during the peri-implantation period. *Biol Reprod* 1999; 61: 892–899.
- 19 Johnson GA, Spencer TE, Burghardt RL, Taylor KM, Gray CM, Bazer FW. Progesterone modulation of osteopontin gene expression in ovine uterus. *Biol Reprod* 2000; 42: 104.
- 20 Kimmins S, MacLaren LA. Cyclic modulation of integrin expression in bovine endometrium. *Biol Reprod* 1999; 61: 1267–1274.
- 21 Lasky LA, Singer M, Dowbenko D, Imal Y, Henzel W, Grimley C. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule *Cell* 1992; 69: 927–938.
- 22 Roberts M. Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2007; 18: 403–408.
- 23 Burgdardt R, Bowen J, Newton G, Bazer F. Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *Reprod Fert* 1997; 52: 151–164.
- 24 Burgess k, Kalph M, Jenkin G, Thorburn, G. Effect of oxytocin and estradiol on uterine prostaglandin release in nonpregnant and early pregnant ewes. *Biol Reprod* 1990; 42: 822-833.
- 25 Lessey BA, Yeh IT, Castelbaum AJ, Fritz MA, Llesanmi AO, Korzeniowski P, et al. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the windows of implantation. *Fertil Sterili* 1996; 659: 477- 483.
- 26 Barnea E, Choi Y, Leavis P. Embryo maternal signaling prior to implantation. En: *textbook of obstetrics gynecology I*. Munteanu. Ed. SIEP, Boston 2000.
- 27 Thatcher W, Moreira F, Santos J, Mattos R, Lopez F, Pancarci S, et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2002; 55: 75–90.

- 28 Olivera M. Gestación. En Galina C. (Ed), Reproducción de animales domésticos. México: Ed. Limusa; 2006.
- 29 Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Creminon C, Guillomot. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol Reprod* 1997; 57: 1032–1040.
- 30 Campanile G, Di Palo R, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B. Corpus luteum and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology* 2007; 67: 1393–1398.
- 31 Battye K, Parkinson T, Lenner L, Evans G, O'Neill C, Lamming G. Potential synergism between platelet-activating factor and 1 – recombinant interferon in promoting luteal maintenance in cyclic ewes. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 21.
- 32 Baruselli P, Bó G, Reis E, Marques M, Sá M. Introducción de la IATF en el manejo reproductivo de rebaños de ganado de engorde en Brasil. Bogotá, Colombia: Congreso Internacional de Reproducción Bovina; 2005.
- 33 Mantovani A, Baruselli P, Bó GA, Cavalcante A, Gacek F. Aumento de las dimensiones del folículo dominante y del cuerpo lúteo, concentración plasmática de progesterona y de la tasa de aprovechamiento de receptoras de embriones bovinos sincronizadas con CIDR-B® por tiempo prolongado. *Revista Brasileira de reproducción animal* 2002.
- 34 Vasconcelos J, Sartori R, Oliveira H, Guenther J, Wilbank M. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001; 56: 307–314.
- 35 Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2007; 99: 34-43.
- 36 Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipients and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 287–297.
- 37 Mann G, Fray M, Lamming G. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet J* 2006; 171: 500–503.
- 38 Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2004; 57: 1371–87.
- 39 Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 703–714.
- 40 Mann GE, Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim* 1999; 34: 269–274.
- 41 Baruselli P, Marques O, Nasser LF, Reis EL, Bó G. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology* 2003; 59: 214.
- 42 Murphy B, Martinuk S. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews* 1991; 12: 27–44.
- 43 Madureira EH, Marques MO, Baruselli P, Nasser LF, Rodrigues CA. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise Retrospectiva). *Acta Scientiae Veterinariae* 2004; 32(suplemento): 228.
- 44 Everton L, Baruselli P. Sincronización de receptoras cruce por cebú en condiciones tropicales. Bogotá, Colombia: Cuarto seminario de reproducción de grandes animales (memorias); 2003.

- 45 Melanie J, Starbuck A, Dailey E, Keith I. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle Anim Reprod Sci 2004; 84: 27–39.
- 46 Nasser L, Reis E, Oliveira M, Bó GA, Baruselli P. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. Anim Reprod Sci 2004; (82),(83):479–486.
- 47 Quesada JM y Ortiz JJ. Sincronización de receptoras de embriones tratadas con CIDR, benzoato de estradio, D Cloprostenol asociado o no a eCG. IRAC: VII Simposio de reproducción animal; 2007.
- 48 Mamani E, Ortiz J, Quezada M. Evaluación de diferentes dosis de eCG en tratamientos de sincronización de celos en receptoras de embriones. IRAC: VII simposio de reproducción animal; 2007.
- 49 Bó GA. Sincronización de celos para programas de Inseminación Artificial y Transferencia de embriones Bovinos. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba Argentina (IRAC) 2003.
- 50 Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen – thawed embryos. Theriogenology 2002; 58: 1597-606.