

La recolección de embriones en ovejas

Principales factores de influencia

Antonio Gómez Peinado

Veterinario Técnico en TE de Esabe Agropecuaria, S. A.

La transferencia de embriones en ganado ovino ha evolucionado considerablemente en estos últimos años, pero no obstante, existen unos problemas de tipo endocrino y anatómico que en parte condicionan la expansión de esta técnica.

Tiene una gran importancia conocer los procesos que se desarrollan para originar la diferenciación de los folículos preovulatorios en la oveja como fundamento para el desarrollo de técnicas de reproducción (superovulación). En la oveja la foliculogénesis se puede dividir en dos partes de acuerdo con los requerimientos foliculares de gonadotropinas:

1. Foliculogénesis basal (ausencia de gonadotropinas).
2. Foliculogénesis activa (requiere gonadotropinas).

La foliculogénesis activa alcanza folículos a partir de 2 mm. de tamaño. En este momento los cambios morfológicos y funcionales son muy grandes, hasta llegar a folículos ovulatorios. Estos cambios pueden variar de forma natural para inducir superovulación, después de producirse la diferenciación folicular.

En los ovarios existe una serie de factores como el número, tamaño y



Ovejas de raza manchega, nacida de embrión. La TE se realizó por el método cruento.

atresia de la población folicular después del celo. El folículo preovulatorio en la oveja tiene un tamaño de 6 a 8 mm., para llegar a este tamaño se suceden una serie de cambios morfológicos:

— En la fase de proestro existe una activación a nivel de la población folicular, pero no se puede determinar con seguridad cual sería el folículo ovulatorio hasta el día del celo.

— De todos estos folículos activados la mayor parte se transformarán en atrésicos, tan sólo uno o dos (dependiendo de la especie) serán folículos de Graaf o folículos dominantes.

El conocimiento de los folículos que controlan la foliculogénesis va a ser muy importante para obtener los rendimientos que se persiguen. En los folículos antrales, (folículos secundarios), hay una disminución de la actividad mitótica de las células de la granulosa y de la teca, este es el cambio de la división a la diferenciación.

A nivel folicular estas células de la granulosa y de la teca, producen una serie de reguladores del crecimiento e inhibición del folículo:

- En la granulosa se produce:
1. FGF. Factor crecimiento de fibroblastos.



Grupo de receptoras, sincronizadas con las donantes para series implantando los embriones en fresco.

2. FEF. Factor estimulante del folículo; incrementa la biosíntesis de estradiol y de progesterona.

3. Inhibina. Se encuentra en los folículos medios y sobre todo los grandes son los que liberan mayor cantidad.

4. Activina.

— En la teca se produce:

1. EGF. Factor crecimiento epidermis.
2. TGF beta. Factor de crecimiento y transformación, esta proteína es producida también por la granulosa.

Además a nivel ovárico se han detectado otras sustancias que van a participar en el desarrollo folicular:

a. LHRBI. Sustancia que produce el cuerpo lúteo al ir envejeciendo. Inhibidor de la unión de la LH a sus receptores. Bloquea el estímulo gonadotrópico de su biosíntesis hormonal.

b. LH-RH OVARICA. Aunque su origen es fundamentalmente hipotalámico, también existe una cierta producción a nivel ovárico donde es capaz de disminuir la acción estimuladora de la FSH.

c. OMI. Inhibidor de la maduración de oocitos. La acción de las gonadotropinas es la que consigue que el oocito bloqueado en la profase de la



Clara reacción del ovario en la oveja, después de la superovulación.

meiosis continúe su maduración y pueda salir a las trompas. Es la sustancia presente en el folículo y responsable del bloqueo madurativo.

d. Activador del Plasminógeno. Cuando el folículo alcanza su maduración total, se va a producir la ruptura del mismo y la salida del ovocito al exterior durante la ovulación. Existe un sistema que activando el plasminógeno va a formar plasmina que será capaz de romperlo en el momento de la ovulación. Si existe un sistema activador el plasminógeno tiene que estar en el interior folicular y de alguna manera debe estar relacionado con el medio hormonal de dicho folículo. Existe un activador de plasminógeno del tipo TPA que es estimulable fundamentalmente por estrógenos.

e. FIM. Factor inhibidor de la meiosis. Se encuentra en el folículo preantral que inhibe la meiosis del ovocito.

La división celular es controlada de manera que la FSH aumenta la incorporación de timidina en el DNA de las células de la granulosa, sin embargo este efecto desaparece rápidamente.

También se produce un efecto estimulador a causa de la FEF y la EGF.

La diferenciación de las células de la granulosa se produce por el aporte de FSH, originando la aromatización, y es potenciado por la FEF, la TGF beta y la activina.

La diferenciación de las células de la teca es controlada por la producción de andrógenos. La producción de androstenediona es estimulada por la LH y a su vez es modulada por factores de crecimiento y proteínas (inhibina, EGF, etc.).

El reclutamiento folicular viene a ser muy parecido a otras especies. En la oveja el desarrollo folicular es bloqueado por depresión de las gonadotropinas. La FSH induce el reclutamiento. Los niveles basales de LH están también implicados en el reclutamiento folicular, ocurriendo de forma similar durante la fase folicular temprana y la fase lutea temprana, cuando el modelo de pulsatividad de LH de estos dos estados es diferente. Sin embargo, la FSH es la hormona clave para el reclutamiento folicular.

La selección folicular puede ser debida a una interferencia de los folículos grandes maduros en contra de los

pequeños, ya que estos no reciben el adecuado soporte gonadotrópico.

Esto puede ocurrir de dos formas: 1) De forma pasiva, cuando el folículo mayor maduro inhibe indirectamente el crecimiento del menor, por reducir la concentración de FSH que es necesaria para su maduración. 2) De forma activa, la maduración folicular inhibe directamente el crecimiento de los pequeños folículos madurados por secreción de sustancias que reducen su sensibilidad a la FSH. En la oveja la selección suele ser la pasiva, además el estradiol y la inhibina, desde el líquido folicular, interaccionan en el control de la secreción de FSH y actúan mediante un mecanismo de feedback negativo, para suprimir la concentración de FSH. Esto se debe a que hay un límite de incremento de gonadotropina hasta la mitad de la fase folicular. También cabe destacar el efecto provocado por la liberación de inhibina por parte de los folículos grandes.

Sobre la dominancia folicular, en primer lugar está claro que el folículo seleccionado continúa su maduración en presencia de FSH y a la vez existe una preferencia de estos a captar con sus receptores la mayor cantidad de FSH.

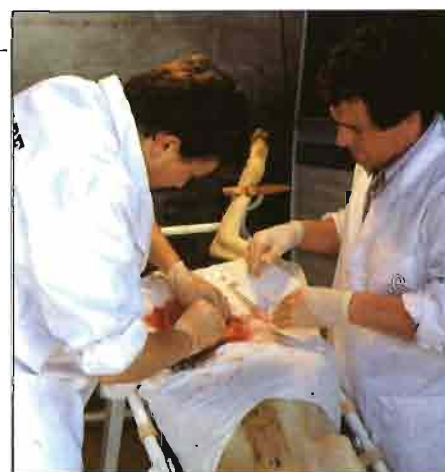
Se ha podido comprobar también que existen unos cambios de la permeabilidad vascular asociado con la maduración, produciéndose una acumulación selectiva de gonadotropinas entre el fluido folicular y el folículo dominante.

También a nivel celular existen en el folículo dominante mayor número de células con receptores afines a la FSH.

SUPEROVULACION

La FSH aplicada exógena, usada en superovulación, actúa por reclutamiento de folículos pequeños, incluso los atrésicos (con PMSG); sin embargo, ovejas muy prolíficas con superovulación prácticamente natural maduran numerosos folículos con buena calidad de ovocitos.

Los índices altos de ovulación en ovejas prolíficas, están asociados a alteraciones en la morfología y funcionamiento de los folículos ovulatorios. Estos folículos normalmente son pequeños aunque existe una diferencia



Operación de TE realizada por el método cruento.



Abordaje del útero de una oveja por el método laparoscópico (semi-cruento).



Vista del genital interno femenino por el laparoscopia.



La colocación de la sonda, por el método incruento, dentro de cada cuerno uterino es controlada mediante ecógrafo.



Momento en que se realiza el lavado de los cuernos uterinos, recogiendo el PBS en una placa Petri para su posterior observación.

muy clara dependiendo de la raza. Los folículos de razas prolíficas suelen ser deficientes en estradiol e inhibina.

La inducción a la superovulación con PMSG o FSH varía considerablemente, mientras que la PMSG activa un mayor crecimiento celular a nivel folicular, la FSH madura folículos con mucha mejor calidad de ovocitos.

FACTORES ANATOMICOS

En el estudio anatómico del aparato genital de la oveja, el canal cervical es lo suficientemente consistente como para impedirnos abordar desde el exterior aquellas zonas para llevar a cabo la IA o la TE.

El diámetro del canal cervical es variable dependiendo en gran medida de la edad del animal.

El trayecto del canal tampoco se puede considerar uniforme y con disposición más bien individual que de raza.

Según autores consultados existe una controversia sobre la permeabilidad del canal cervical en el momento del celo. Veterinarios que trabajan en la técnica de la IA comentan que existe un porcentaje de hembras que tiene el cervix permeable a los instrumentos de IA en el momento del celo.

Este problema anatómico ha sido la causa de que las técnicas de TE hayan evolucionado con el tiempo.

En la actualidad podemos considerar tres métodos de TE en la oveja:

1. Cruento.
2. Semi-cruento.
3. Incruento.

1. Cruento. Es llevado a cabo mediante cirugía, previa tranquilización del animal y con anestesia local. Se le practica una incisión de 5 a 7 cm en línea alba a 1 ó 2 cm de la glándula mamaria, abordando el genital interno y exteriorizándolo para realizar el flusing. A nivel de la bifurcación uterina se introduce, previa punción, una sonda del n.º 12 que posteriormente se le insufla un globo que ocluye el cuerno uterino y se introducen entre 7 y 12 ml de PBS, dependiendo del tamaño del cuerno uterino; se realiza un ligero masaje y se recupera dicho líquido por la misma sonda en placas Petri. Esta operación se repite cuatro veces en cada cuerno uterino. Seguidamente se introduce el genital en la cavidad uterina y se sutura por capas. El número de veces que podemos colectar a un animal por este método es reducido, unas 4 ó 5 ocasiones, pero la recuperación de embriones es más segura que en los otros sistemas.

Realizando un buen sistema operatorio

y postoperatorio podría aumentar el número de colectas.

2. Semi-cruento. Consiste en la utilización de un laparoscopio, que sirve para visualizar la operación de recogida en el interior de la cavidad abdominal pélvica. La técnica requiere también tranquilización, anestesia local y una camilla especial para trabajar.

Se precisan tres puntos de punción abdominal, para introducir el laparoscopio para visualizar, el gancho de fijación del cuerno y la sonda de lavado y colecta.

Requiere técnicos muy especializados y la recuperación de embriones no es muy uniforme. La adherencias uterinas provocadas por la operación son menores que con el método cruento, pero también se producen.

El sistema de lavado viene a ser igual o parecido con todos los métodos (introducción de líquido en el cuerno uterino y recuperación).

Además, es necesario trabajar con el abdomen insuflado, bien de aire filtrado o de anhídrido carbónico, y con el animal inclinado con el tercio posterior más alto que el anterior para desplazar las vísceras, así nos permiten visualizar fácilmente el aparato genital.

3. Incruento. Es el método más novedoso y práctico, pero a la vez, precisa de un equipamiento más especializado para llevarlo a cabo.

El principal problema va a ser la dilatación cervical el día 6 del ciclo, para la realización de la colecta.

El proceso consiste en la aplicación de Ig E2 y estrógenos en el animal donante durante 2 días y a los 4 días del celo.

La dilatación cervical se realiza utilizando unas pinzas para exteriorizar la plica genitales y con un dilatador uterino se avanza por el canal cervical. Posteriormente se introduce una sonda Foley flexible con un estilete y mediante control ecográfico, se coloca la sonda en uno de los cuernos uterinos. Seguidamente se insufla el globo y se introduce el PBS para el lavado.

Para llevar a cabo esta técnica se suelen utilizar mesas anatómicas móviles, ya que nos ayudan a realizar un flusing uterino idóneo.

Este método tiene la gran ventaja de que puede ser utilizado en el animal, para colectar embriones, sin riesgo de adherencias en los genitales que pueden comprometer su fertilidad.

DISCUSION

Las metodologías para la colecta de em-

briones de ovejas, han ido evolucionando para hacerla asequible técnicamente y sobre todo sin riesgos para los animales.

En el primer paso que consideramos "la superovulación", encontramos serias dificultades, que se traducen en respuestas muy diferentes entre unos animales y otros, incluso distintas respuestas en un mismo animal. Esto nos indica que los niveles endocrinos no siempre funcionan correctamente sino que existen variaciones individuales, posiblemente influenciadas por el ambiente externo e interno del animal.

Los sistemas de recolección han ido evolucionando tratando de evitar la cirugía y por tanto los problemas que ésta conlleva. La metodología incruenta es relativamente reciente, y hasta el momento no está conseguida al 100 por 100, ya que hay un tanto por ciento de animales que a pesar de los tratamientos no se les puede permeabilizar el canal cervical.

En resumen, podemos decir que la TE en ganado ovino, no está tan estandarizado como en el ganado vacuno pero a pesar de todo se encuentra en un nivel que es factible su realización tanto a nivel técnico como económico.

BIBLIOGRAFIA

- Armstrong, D.T. and Evans, *Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats*. Theriogenology 19:31-42 (1983).
- COONROD, S.A., CORIN, B.R., MURPHY, B.L., BOWEN, M.J. AND KRAEMER, D.C. *Successful non-surgical collection of ovine embryos*. Theriogenology 25: 149 (1986).
- DRIANCOURT, M. A. AND FRY, R.C. *Differentiation of ovulatory follicles in sheep*. J. Anim. Sci. 66: (suppl. 2): 9 - 20 (1988).
- DRIANCOURT, M.A., CASHINGWAY, F., BINDON, B. M., PIPER, L.R., QUIRKE, J.F., AND HANRAHAN, J.P. *Ovarian follicular dynamics in lines of sheep (Finn, Merinos) selected on ovulation rate*. J. Anim. Sci. 68: 2034-2041 (1990).
- DRIANCOURT, M.A. AND CAHILL, L.P. *Preovulatory follicular events in sheep*. J. Reprod. Fert. 71:205-212 (1984).
- L.P. CAHILL. *Determinación de la capacidad de reproducción de las hembras a través del estudio de la folículoogénesis. Receptores ováricos y superovulación. Simposio sobre reproducción de los ovinos y bovinos de carne*. Zaragoza, 22-23 de mayo de 1979.
- MCCLELLY, W.A.C. AND ROBINSON, J.J. *Repeated recoveries of ovine ova by laparoscopy*. Theriogenology 25:71 (1984).
- MCCNATTY, K. P., GIBB, M., DOBSON, C., BALL, K., COSTER, J., HEATH, D. AND THURLEY, D.C. *preovulatory development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin*. J. Reprod. Fert. 65: 111-123 (1982).
- MURRAY, E.R., AND BAKER, A.A. *Transfer of sheep embryos through a laparoscope*. Vet. REC. 114:401-402 (1984).