

# **CRONOLOGIA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN VACAS SUPEROVULADAS DE RAZA ASTURIANA DE LOS VALLES. RESULTADOS PRELIMINARES**

E. Gómez

SERIDA-CENSYRA. Camino de los Claveles 604, Somió, 33203 Gijón  
Principado de Asturias

## **INTRODUCCION**

La obtención de embriones de vacas superovuladas para su uso en aplicaciones biotecnológicas o en mejora ganadera requiere de un conocimiento preciso de la cronología del desarrollo embrionario en el animal vivo. Así, el embrión de 1 célula puede ser utilizado en micromanipulación pronuclear, y el estadio de 16-32 células es un óptimo donador de núcleos para la clonación. La mórula y el blastocisto son los estadios preferentes en multiovulación y transferencia de embriones, por su capacidad para producir gestaciones tanto en fresco como después de ser criopreservados. El objetivo de este trabajo fue conocer la cronología del desarrollo embrionario antes de la implantación en vacas superovuladas de la raza Asturiana de los Valles.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El experimento se llevó a cabo durante los años 1993 y 1994 sobre 15 vacas multíparas de raza Asturiana de los Valles. Las vacas se sometieron a tratamientos de superovulación comenzando entre los días 9 y 12 del ciclo, inyectando por vía intramuscular 500 UI de FSH-p (Schering), o bien 1350 UI de hMG (Pergonal 500), en dosis decrecientes, 2 veces al día durante 4 ó 5 días respectivamente. El celo se indujo con una aplicación de 2 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Estrumate) en el último día del tratamiento. Para detectar el celo, las vacas se observaron 2 veces al día transcurridas 24 horas desde la aplicación de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . La inseminación se realizó con semen congelado de 1 toro de fertilidad demostrada, utilizándose 2 toros a lo largo del experimento. Genotipados recientemente para la mutación del gen de la miostatina, responsable del carácter de hipertrofia muscular (Grobet et al, 1997), un toro resultó ser homocigótico y el otro heterocigótico. Todas las vacas fueron superovuladas en 2 ó 3 ocasiones, con la pretensión de obtener embriones a intervalos aproximados de 24 horas. Los embriones producidos entre los días 6 y 9 procedieron de lavado uterino realizado sobre vacas vivas. Los embriones de 2 a 5 días se recogieron de los oviductos de 9 vacas sacrificadas, en las cuales se lavó también el útero. El medio de lavado y de mantenimiento usado fue PBS con 4 g/L de BSA, y los embriones se valoraron a 50X con ayuda de un estereomicroscopio. Se descartaron aquellos animales en los que el celo no se presentó antes de las 72 horas tras la aplicación de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y sólo se seleccionaron embriones de excelente o muy buena morfología.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

Se realizó un total de 36 lavados, en 5 de los cuales no se recogieron embriones. Entre los 353 huevos obtenidos, se rechazaron 168 (23 oviductales -27%- y 145

uterinos -54%-). No se obtuvo ningún embrión de lavados uterinos de las vacas sacrificadas, aunque en 2 de ellas (días 3 y 4) el lavado uterino no se realizó por problemas técnicos. De otra vaca tampoco se recogieron embriones oviductales, por lo que no se contabilizó. Los resultados del experimento pueden verse en la tabla 1.

Tabla 1. Fases del desarrollo de embriones obtenidos mediante lavados oviductales y uterinos de vacas superovuladas de raza Asturiana de los Valles

Fase	C	Días después del comienzo del celo y embriones obtenidos/día								D	Nº Lavados /Fase
		2	3	4	5	6	7	8			
1 célula	1	14								2	2
2-7 células	2	8	4							2,3	3
8-16 células	3	9	13	7						2,9	5
17-32 células	4				6	4	4			5,8	4
Mórula	5					2	35	11		7,3	12
Blastocisto T	6						13	5		7,3	8
Blastocisto	7						14	23		7,6	11
Blastocisto E+E	8							13		8	7
Nº embriones		31	17	7	6	6	66	52			
E		1,8	2,7	3,0	4,0	4,3	5,7	6,7			
Nº Lavados/Día		3	1	2	2	2	11	9			

C: código adjudicado a cada estadio del desarrollo embrionario. D: Días promedio para cada estadio embrionario. E: Estadío promedio, valorado según el código correspondiente, en cada día del desarrollo. Blastocisto T: blastocisto temprano. Blastocisto E+E: blastocisto eclosionado o expandido

La cronología del desarrollo expuesta difiere en parte de la descrita por otros autores. Brink et al (1994) y Laurincik et al (1994) encontraron que más del 90% de los embriones entre las 40 y 53 h desde el comienzo del celo aún no se había segmentado, en fuerte contraste con el 54% (17/31) de divididos por nuestra parte (40 a 55 h). Además, todos los embriones divididos de Brink estaban en fase de 2 células, frente al 35% (11/31) de embriones de 4 y 8 células en nuestro trabajo. Le Guienne et al (1990) y Ménéz et Renard (1991) aprecian que el intervalo de tiempo para los embriones de 8 a 16 células es de 60-90 h y 68-91 h, respectivamente. En nuestro trabajo, los 29 embriones de 8 a 16 células aparecieron en el período de 50 a 74 h (7 de ellos recogidos a las 50 horas), aunque el día promedio de aparición (2,9) es equiparable al dado por estos autores (día 3, Le Guienne et al, y día 2,75, Ménéz et Renard). Es necesario ser cauteloso con la interpretación de estos datos, puesto que estas discrepancias pueden ser fruto de la aplicación de los tratamientos y del cálculo de los días de desarrollo embrionario.

Otro hecho relevante es el retraso (día promedio: 5,8) con que aparecieron los embriones de 17 a 32 células (entre 120-165 horas), que contrasta con las 91-110 horas descritas por Ménéz et Renard y las 90-125 de Le Guienne et al. Más que a una excesiva prolongación del período de activación del genoma embrionario (Telford et al, 1990), este retraso puede deberse a que los lavados uterinos en vacas sacrificadas no hubiesen sido realizados de manera eficiente, con posible pérdida de los más avanzados embriones uterinos de los días 4 y 5. La presencia de embriones de este tipo acortaría el intervalo entre 8-16 y 17-32 células. De acuerdo con lo anterior, se ha descrito un tránsito prematuro desde el oviducto hacia el útero en vacas superovuladas (Hackett et al, 1993; Newcomb et al, 1976). Hackett et al (1993)

realizan lavados en días 4, 5 y 6, con predominio de embriones de 8, 16 y >16 células respectivamente. La realización de este trabajo, en que las hembras se inseminaron a un tiempo fijo tras la aplicación de prostaglandina F<sub>2α</sub>, no permite establecer comparaciones con nuestros datos.

Aunque en nuestro trabajo la mayoría de los estadios embrionarios se encuentran bien representados, es necesario trabajar más sobre las fases intermedias. Además, mediante cultivos in vitro, se han constatado diferencias entre toros que afectan a duración de la fase S del cigoto y al momento de la división del embrión (véase Schneider et al, 1999). El trabajo de Le Guienne et al (1991) se refiere a vacas superovuladas, pero Ménéz y Renard (1990) no indican el origen de los embriones que emplearon. Crisman et al (1980) muestran datos parecidos para el embrión de menos de 8 células, aunque se trata de vacas no superovuladas y un bajo número de casos (10 embriones).

La distribución de embriones observada en los lavados uterinos durante los días 6, 7 y 8 concuerda con lo descrito por Le Guienne et al y también por Ménéz y Renard. Es necesario, sin embargo, realizar un número de lavados adicionales en día 6 del ciclo. El conocimiento de la cronología del desarrollo embrionario en la raza Asturiana de los Valles es particularmente importante por la presencia de la mutación para el gen de la miostatina en más del 90% de los animales del libro genealógico (datos propios). El gen salvaje (miostatina; Mc Pherron et al, 1997) pertenece a la superfamilia de genes Transforming Growth Factor-β, codificante de factores importantes en la regulación del desarrollo embrionario. Por lo tanto, el genotipo de los toros utilizados en el presente experimento (uno homocigótico y otro heterocigótico para el carácter de hipertrofia muscular) podría haber dado lugar a un número significativo de embriones portadores y afectar al desarrollo. El presente trabajo apunta la posibilidad de un desarrollo embrionario más rápido para los primeros estadios en raza Asturiana de los Valles.

## REFERENCIAS

- Brink Z, et al (1994) *Theriogenology*, 41:168.  
Crisman RO, et al (1980) *Am. J. Vet. Res.* 41:645-647.  
Grobet L, et al (1997) *Nature Genetics* 17:71-74.  
Hackett AJ et al (1993) *Theriogenology*, 40:1147-1153.  
Laurincik J et al (1994). *Theriogenology*, 42:1285-1293.  
Le Guienne B et al (1990) *Elev. Ins.* 235:5.  
McPherron AC et al (1997). *Nature.* 387:83-90  
Ménéz Y et Renard JP (1990) *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*; pp 339-402.  
Newcomb R et al (1976) The entry of superovulated eggs into the uterus. En: Rowson LEA (ed), *Egg transfer in cattle.* 1976; 5491:1-15.  
Schneider CS et al (1999) *Theriogenology*, 51:1085-1098.  
Telford NA et al (1990). *Mol. Reprod. Dev.* 26:90-100.