

# ANÁLISIS MULTIFACTORIAL DE LAS TASAS DE PREÑEZ EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN COLOMBIA

## MULTIFACTORIAL ANALYSIS OF PREGNANCY RATES IN EMBRYOS TRANSFER PROGRAMS IN COLOMBIA

Juan Rodríguez M<sup>1\*</sup>, Zoot, Carlos Giraldo E<sup>1</sup>, M.Sc, Susana Castañeda P<sup>2</sup>, MVZ, Tatiana Ruiz C<sup>1</sup>, Ph.D, Martha Olivera A<sup>1\*</sup>, Dr. Sci. Agr.

Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, <sup>1</sup>Grupo Fisiología y Biotecnología Animal, Medellín, Colombia. <sup>2</sup>Práctica privada. \*Correspondencia: cargiraldo@gmail.com

Recibido: Agosto 23 de 2007; Aceptado: Diciembre 10 de 2007

### RESUMEN

**Objetivo.** Analizar varias características del embrión transferible, así como algunas características de las receptoras sobre las tasas de preñez. **Materiales y métodos.** Se evaluaron ciento setenta y cuatro transferencias en dos haciendas en Colombia. Las variables analizadas en las receptoras fueron los niveles de progesterona sérica, tamaño del cuerpo lúteo y el grupo genético. Las variables analizadas en los embriones fueron estadio de desarrollo, calidad y transferencia en fresco o congelado. **Resultados.** Ninguna de las variables individualmente predicen la tasa de preñez, sin embargo, existe la probabilidad de un mejor resultado cuando se usa un embrión excelente congelado (OD=5.100), bueno fresco (OD= 4.180) y si la receptora es  $\frac{3}{4}$  Angus (OD=2.945). **Conclusiones.** La tasa de preñez sigue siendo un evento regulado de manera multifactorial y ninguno de los parámetros evaluados individualmente son responsables del éxito reproductivo.

**Palabras clave:** Cuerpo lúteo, progesterona, raza, transferencia de embriones.

### ABSTRACT

**Objective.** To analyze several characteristics of transferable embryo, as well as some of receptors on the pregnancy rates. **Materials and methods.** Hundred seventy four transfers were evaluated in two farms in Colombia. The analyzed variables in the receptors were serum progesterone levels, corpus luteum size and genetic group. The analyzed variables in embryos were stage of development, quality and transfer

in fresh or frozen. **Results.** None of the variables individually predicts the rate of pregnancy, however, the probability of a better result exists when a frozen excellent embryo is used (OD=5.100), good fresh (OD = 4.180) and if the receptor is  $\frac{3}{4}$  Angus (OD=2.945). **Conclusions.** The pregnancy rate continues being a regulated event in multifactorial way and none of the evaluated parameters individually is responsible for the reproductive success.

**Key words:** Corpus luteum, progesterone, breed, embryos transfer.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia, la transferencia de embriones ha cobrado gran importancia en las últimas dos décadas, en procura de obtener animales de alto valor genético, incrementando la progenie de vacas élite.

Las tasas de preñez por transferencia de embriones, reportadas en Colombia no superan el 50%, comparadas con porcentajes de EEUU y Europa del 80% (1). Se presume que las bajas tasas de preñez, cuando se transfieren embriones de buena calidad frescos o congelados, podrían estar relacionadas con la calidad del cuerpo lúteo (tamaño y concentración de progesterona), el grado de sincronía y, la raza (o cruzamiento) de la receptora (2).

Según Chagas e Silva, et al (3), las concentraciones bajas de progesterona ( $P_4$ ) en plasma, al momento de la transferencia, son un reflejo de una función lútea subnormal, que puede estar influenciada por una asincronía debida a la mala detección de calores y/o inadecuada sincronización de los animales, o por folículos ovulatorios de menor tamaño del normal, lo que produce un cuerpo lúteo de baja funcionalidad (4).

Para el reconocimiento materno-embriionario, el embrión debe encontrar

un medio uterino apropiado, influido por la progesterona ( $P_4$ ) lútea, ya que ésta estimula la producción de una variedad de secreciones endometriales tales como el MUC-1 (mucin glycoprotein-1), lactógeno placentario, osteopontinas, necesarias para el adecuado desarrollo de los embriones (5). Por lo tanto, debe detenerse el proceso luteolítico mediante la expresión de interferón- $\tau$  (int- $\delta$ ) por parte del embrión, evitando la muerte embrionaria temprana (6), o favoreciendo la acción de la progesterona sobre el endometrio que conlleva a la inactivación de la producción de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) de forma prematura evitando la formación cuerpos lúteos de corta duración (7).

Por otra parte, la raza (cruzamiento), ejerce algún tipo de efecto con respecto al tamaño del cuerpo lúteo (por el tamaño del folículo ovulatorio y el número de células de la granulosa), lo cual puede estar ejerciendo un efecto positivo o negativo sobre las tasas de concepción, o la raza estar a su vez actuando directamente sobre las tasas de preñez, como lo reporta Olson (8).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si existe un efecto sobre la tasa de preñez por parte del tamaño del CL, la concentración de progesterona circulante y la raza de la receptora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** Las receptoras se encontraban localizadas en las haciendas: (a) "Río Piedras" (Jericó, Antioquia, Colombia), temperatura promedio de 25°C, a 750 msnm, bosque húmedo seco tropical (9); (b) "Cuba" (Montelíbano, Córdoba, Colombia), temperatura promedio de 28°C, a 50 msnm, bosque seco tropical (9).

**Grupo genético de las receptoras.** Se evaluaron ciento setenta y cuatro receptoras entre 2 y 6 años, con las siguientes conformaciones raciales: Brangus ( $n=20$ ), Romo/Angus/Cebú ( $n=30$ ), Cebú/Angus ( $n=6$ ), Blanco orejinegro/Angus/Cebú ( $n=24$ ),  $\frac{3}{4}$ Angus ( $n=5$ ); Angus/Cebú ( $n=59$ ); Otros ( $n=30$ ).

**Clasificación y evaluación de los embriones.** Los embriones fueron calificados basándose en sus características morfológicas: (a) forma del embrión, (b) color y textura de la masa celular, (c) número y grado de compactación de las blastómeras, (d) diferencia de tamaño entre blastómeras, (e) tamaño del espacio perivitelino, (f) presencia de blastómeras sueltas, degeneradas, o detritus celular, (g) presencia, número y tamaño de vesículas y (h) apariencia de la zona pelúcida (10).

Los embriones de calidad 1 fueron congelados de forma lenta en un congelador de nitrógeno líquido (Freeze Control®, Cryologic, referencia CL2000) usando Ethylene Glycol 1.5M (Vigro Ethylene Glycol Freeze Plus®) y posteriormente transferidos; los de calidad 2 y 3 se transfirieron en fresco (11).

**Medición de variables.** El día de la transferencia se determinó el diámetro (mm) del cuerpo lúteo con ultrasonografía

transrectal (Aloka SSD-500V, transductor lineal 7.5 Mhz, Japón). Se usaron solamente receptoras que tuviesen  $CL > 14$  mm. Inmediatamente antes de la transferencia, se recolectó una muestra de sangre por punción de la vena caudal media (Becton Drive Vacutainer® FERUM, NY, US) con el fin de determinar la concentración de P<sub>4</sub>. El suero se separó por medio de centrifugación y se congeló a -20°C hasta su procesamiento. La concentración de P<sub>4</sub> fue determinada por radioinmunoensayo (RIA). A los 60 días postransferencia se determinó la gestación por ecografía.

**Análisis estadístico.** Las variables determinadas fueron: concentración de P<sub>4</sub> sérica (ng/ml), tamaño del CL (diámetro en mm), tasas de preñez (%), la raza (grupo genético), calidad del embrión (1= Excelente; 2= Bueno; 3= Regular), estadio embrionario (4= Mórula compacta; 5= Blastocisto temprano; 6= Blastocisto; 7= Blastocisto compacto) (Tabla 1). Se realizó un análisis de regresión logística teniendo como variable dependiente el estado reproductivo del animal (vacía-preñada), siendo dicha variable de tipo binario, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\ln(p/q) = a_0 + a_1(\text{concentración } P_4) + a_2(\text{mm CL}) + a_3(\text{calidad del embrión}) + a_4(\text{estadio del embrión}) + a_5(\text{raza})$$

Donde:

$\ln(p/q)$  = probabilidad de que el animal quede preñado

$a_0$  = intercepto de la regresión.

$a_1$  = efecto de la concentración sérica de progesterona (ng/ml).

$a_2$  = efecto del tamaño del cuerpo lúteo (mm).

$a_3$  = efecto de la calidad del embrión (excelente; bueno; regular).

$a_4$  = efecto del estadio del embrión (mórula compacta, blastocisto temprano, blastocisto, blastocisto compacto).

$a_5$  = efecto de la raza: Brangus (n=20), Romo/Angus/Cebú (n=30), Cebú/Angus (n=6), Blanco orejinegro/Angus/Cebú (n=24),  $\frac{3}{4}$ Angus (n=5); Angus/Cebú (n=59); Otros (n=30).

También se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación a todos los datos de las dos variables cuantitativas existentes, tamaño del cuerpo lúteo (mm) y concentración de progesterona (ng/ml de sangre).

Posteriormente se realizó una prueba de Tukey entre los estadios embrionarios (mórula compacta, blatocisto temprano, blastocisto compacto, blastocisto expandido), tanto de los embriones frescos como de los congelados. Igualmente se aplicó la misma prueba entre los tipos de embrión (frescos y congelados).

La relación de probabilidad o grado de probabilidad de que las variables independientes tengan un efecto sobre la variable dependiente: estado reproductivo del animal (vacía-preñada), también fue

calculado como el *Odds Ratio (OR)*. El análisis estadístico fue realizado con el programa SAS versión 9.1.

## RESULTADOS

Se utilizaron 174 receptoras, de las cuales (n=51) fueron transferidas con embriones frescos, (n=46) con embriones calidad 2 (n= 5) y con embriones de calidad 3; las receptoras restantes (n=123) transferidas con embriones congelados de calidad 1. Se transfirieron embriones en estadio 4 (n=44) y estadio 5 (n=6) en fresco y, en estadio 4 (n=42), estadio 5 (n=38), estadio 6 (n=27) y estadio 7 (n=16) congelados. La tasa de preñez total, teniendo en cuenta tanto frescos como congelados, fue de 42% (73 de 174). La tasa de preñez con embriones frescos (31%, 16 de 51) fue menor que con embriones congelados (46%, 57 de 123; Tabla 1). Con respecto al estadio embrionario, la tasa de preñez en general fue mayor en los estadios 5, 6 y 7, oscilando alrededor del 50%.

**Tabla 1.** Efecto del tipo, estadio y grado de embrión sobre la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones.

Estadio	Embriones (No)	Estado reproductivo		Preñez (%)	
		Preñadas	Vacías		
<b>Frescos</b>					
		CL(14-22mm) P4(0,501-14,2807ng/ml)		CL(16-20mm) P4(0,0171-8,3809ng/ml)	
	4	44	13	31	29,54%
	5	6	3	3	50,00%
	6	1	0	1	0,00%
	7	0	0	0	0,00%
<b>TOTAL</b>	<b>51</b>		<b>16</b>	<b>35</b>	<b>31,37%</b>
<b>Congelados</b>					
		CL(14-26mm) P4(0,5988-12,632ng/ml)		CL(17-26mm) P4(0,2914-9,1354ng/ml)	
	4	42	16	26	38,09%
	5	38	19	19	50%
	6	27	14	13	51,85%
	7	16	8	8	50,00%
<b>TOTAL</b>	<b>123</b>		<b>57</b>	<b>66</b>	<b>46,34%</b>

Se realizó una correlación (no mostrada) entre todas las variables independientes (concentración de P<sub>4</sub> sérica (ng/ml), tamaño del CL (diámetro en mm), la raza (grupo genético), calidad del embrión, estadio embrionario, para determinar la existencia de un efecto de colinealidad entre dichas variables y de este modo evitar interferencias dentro del modelo estadístico por dicho efecto. No se halló correlación alguna.

La media para los valores del diámetro del CL (mm) fue de 19.6 ± 1.8 mm con un coeficiente de variación bajo (9%), mientras que la media de la P<sub>4</sub> fue de 3.6 ± 2.6 ng/ml de sangre con un coeficiente de variación bastante elevado (74%).

No se halló diferencia significativa entre los diferentes estadios embrionarios (mórula compacta; blastocisto

temprano; Blastocisto compacto; blastocisto expandido) al igual que tampoco entre el tipo de embrión (frescos vs. congelados) de acuerdo con la prueba de Tukey realizada.

Como se aprecia en la tabla 2, ninguna de las variables independientes fue significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al estado reproductivo de los animales (preñada-vacía), aunque fue mayor con los embriones congelados (calidad 1,  $P = 0.1778$ ) que con los embriones transferidos en fresco (calidades 2 y 3,  $P = 0.2597$ ).

Con respecto al *Odd Ratio (OR)*, las variables independientes que obtuvieron los valores más elevados fueron las calidades de embrión excelente (calidad 1 = congelado,  $OR = 5.100$ ) y bueno (calidad 2 = frescos,  $OR = 4.180$ ), seguidos finalmente por uno de los grupos genéticos (TC =  $\frac{3}{4}$ Angus,  $OD = 2.945$ ).

**Tabla 2.** Regresión Logística del estadio, calidad embrionaria, raza, diámetro del CL y concentración de progesterona.

Variable*	Coficiente	Err. Estan.	Chi <sup>2</sup>	P
Intercepto	0.3383	2.4241	0.0195	0.8890
Calidad 1	1.6292	1.2089	1.8162	0.1778
Calidad 2	1.4302	1.2689	1.2704	0.2597
Blast. Expa	0.4781	0.6568	0.5299	0.4666
Blastocisto	0.6227	0.5232	1.4165	0.2340
Blast. Tem	0.4844	0.4571	1.1231	0.2892
Angus/Cebú	0.1254	0.5619	0.0498	0.8235
Brangus	-0.5008	0.6693	0.5597	0.4544
BAC	-0.0899	0.6273	0.0205	0.8861
RAC	-0.3304	0.6043	0.2989	0.5846
TC	1.0800	1.1053	0.9548	0.3285
ABC	0.5922	1.3797	0.1842	0.6678
Cebú/Angus	-0.0897	1.0310	0.0076	0.9307
CL(mm)	-0.1381	0.1019	1.8357	0.1755
Conc. P <sub>4</sub>	0.0755	0.0661	1.3074	0.2529

BAC= Bon/Angus/Cebú, RAC= Romo/Angus/Cebú, TC=  $\frac{3}{4}$  Angus, ABC= Angus/Bon/Cebú, CL= Cuerpo lúteo (mm), Conc. P<sub>4</sub>= Concentración Progesterona (P<sub>4</sub>)

\* = Ninguna de las variables independientes fue significativa ( $p \leq 0.5$ )

## DISCUSIÓN

La preñez de las receptoras no depende de ninguna de las variables en forma independiente. Sin embargo, la calidad del embrión y el diámetro del cuerpo lúteo se destacan sobre las otras variables con un  $P= 0.1778$  y  $0.1755$  respectivamente (Tabla 2). Incluso, ni la concentración de  $P_4$  en este estudio mostró ser determinante para el establecimiento de la preñez, lo cual contradice estudios, que reportan la importancia de la secreción de  $P_4$  postovulatoria proveniente de un cuerpo lúteo en desarrollo sobre el resultado de una preñez temprana (12). De hecho, la concentración de progesterona al momento de la transferencia es una de las variables consideradas como determinantes para que se de el establecimiento de la preñez, como lo reportan Chagas y López (2), donde bajas concentraciones de  $P_4$  posteriores a la ovulación o un retraso en el incremento de la  $P_4$  fueron asociadas con un pobre desarrollo embrionario y posterior sobrevivencia de los mismos. De igual manera, dichos autores postulan como punto de partida la existencia de una relación entre una concentración de  $P_4$  por encima de lo normal al día de la transferencia y la tasa de preñez como de gran importancia para la selección de receptoras. Sin embargo, los niveles de  $P_4$  séricos o en plasma al momento de la transferencia fueron relacionados hasta cierto punto con la tasa de preñez en algunos estudios, mientras que otros no encontraron relación alguna (2), como es el caso del presente trabajo, donde se obtuvo que la  $P_4$  ( $p= 0.25$ ) no fue significativa, por ende, dicha variable no ejerció efecto sobre la tasa de preñez.

De todos modos, la existencia de un umbral en los niveles de progesterona para evitar que se de la muerte embrionaria es controversial, ya que algunos estudios (13, 14) reportan preñeces en receptoras con concentraciones de  $P_4$  sérica  $<1$  ng/ml al momento de la transferencia; tal es el caso del presente estudio. Además, valores de progesterona bajos al momento de la transferencia podrían reflejar no solo una función lútea anormal, sino también inexactitud en la detección de calores (13, 14).

Por otra parte, es cinco veces más probable que un animal quede preñado cuando se le transfiere un embrión de calidad excelente. De igual forma sucede con un embrión de calidad buena, es cuatro veces más probable que una hembra quede preñada con este tipo de embrión, a que ocurra el evento con alguna de las demás variables. Por otra parte, se evidenció el efecto de la raza, específicamente a través del grupo genético  $3/4$ Angus (TC), el cual indica que es tres veces más probable que una receptora quede preñada cuando su conformación racial es de este tipo. De hecho Olson et al (8), utilizando animales Angus, Brahman y Charolais reportaron que de acuerdo con la conformación racial que se tenga, se podría aumentar o disminuir la tasa de preñez y algunas otras características.

En conclusión, se encontró que de todas las variables independientes analizadas en el estudio, las determinantes para que ocurra la preñez fueron: calidad excelente del embrión (congelados), calidad buena del embrión (frescos) y grupo racial o cruce.

## REFERENCIAS

1. Gómez CJ. Transferencia de embriones experiencias en Colombia. Memorias del Congreso Internacional de Reproducción Bovina (Intervet), Bogotá, 2005, p.155-158.
2. Chagas e Silva J, López da Costa L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentration and embryo survival. *Theriogenology* 2005; 64:49-60.
3. Chagas e Silva J, López da Costa L, Robalo Silva J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetalmortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology* 2002; 58(1):51-9.
4. Serrano NC, Olivera ÁM. Caracterización de la función lútea durante el primer ciclo posparto inducido por medio de un progestágeno en vacas cebú Brahman en amamantamiento. *Rev Col Cienc Pec* 1997; 10(1): 29-37.
5. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation Mechanisms: Insights the Sheep. *Reproduction* 2004a; 128: 657-668.
6. Demmers KJ, Derecka K, Flint A. Trophoblast Interferon and Pregnancy. *Reproduction* 2001; 121:41-49.
7. Spencer TE, Bazer FW. Conceptus Signals for Establishment and Maintenance of Pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:1-15.
8. Olson TA, Peacock FM, Koger M. Reproductive and Maternal Performance of Rotational, Three-Breed, and *Inter Se* Crossbred Cows in Florida. *J Anim Sci* 1993; 71:2322-2329.
9. Sierra JO. Ecofisiología de las Especies Forrajeras. En: Sierra P JO. Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros, 1a. ed. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2002; p.66-107.
10. International Embryo Transfer Society (IETS). The third edition of the IETS Manual, 2005.
11. Tribulo H, Bo G. Biotecnologías Reproductivas. En: Galina C, Valenci J. Reproducción de animales domésticos, 2a. ed. México, Editorial Limusa, S.A de C.V 2006; p.539-570.
12. Mann GE, Robinson RS, Hunter MG. Corpus luteum size and function following single and double ovulation in non - lactating dairy cows. *Theriogenology* 2007; 67:1256-1261.
13. Bo GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. The Timing of Ovulation and Insemination Schedules in Superstimulated Cattle. *Theriogenology* 2006; 65:89-101.
14. Inskeep E.K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effect of concentration of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 2004; 82(Suppl.): 24-39.