

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

División de ciencias Veterinarias



MANUAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

"CD INTERACTIVO"

Tesis profesional
OPCIÓN MATERIAL DIDÁCTICO

Para obtener el título de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:
P.M.V.Z. JUAN SEBASTIAN ISAZA CORREA

Director:
M. En C. JUAN JESUS ROA VIDAL .

Las Agujas, Zapopan, Jalisco Octubre 2005

CONTENIDO

	Página
PRÓLOGO	X
INTRODUCCIÓN	
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS	3
MATERIALES Y MÉTODOS	4
GUIÓN	5
Organización y desarrollo de la transferencia de Embriones ET	5
Medidas de higiene durante la realización de la ET	7
Animales Donantes	10
Animales Receptores	35
Recolección de Embriones	42
Transferencia de Embriones	65
Almacenamiento y Conservación de Embriones	73
BIBLIOGRAFIA	92

JUSTIFICACIÓN

La ET merece una gran consideración y adquiere cada vez más importancia en el ámbito de la ayuda internacional a países en vías de desarrollo. Al principio se comenzó con cursos de ET, clases teóricas y demostraciones prácticas en distintas universidades para promover esta técnica y entre tanto, también se realizan ya transferencias de embriones congelados. La implantación de embriones crioconservados de alto valor genético contribuye a la renovación sanguínea de poblaciones aisladas en países en desarrollo, promueve la inseminación artificial y comienza a sustituir al comercio de animales vivos (importación/exportación). Las ventajas consisten en que, por un lado, los costes de transporte y adquisición de embriones son mucho menores que los que conllevan los animales vivos y, por otro y mucho más importante, que los terneros de ET se adaptan muchísimo mejor a un ambiente específico nuevo (resistencia adquirida a través de anticuerpos calostrales).

Este CD Interactivo, se creó con el fin de proporcionar un material más didáctico en las clases de Transferencia de Embriones en Bovinos, debido a su contenido de fotos, video y explicaciones que hacen más fácil para el alumno comprender todos los términos.

OBJETIVOS

General

Crear un material didáctico con el fin de entender fácilmente todos los conceptos referentes a la transferencia de embriones en bovinos.

Específicos

Generar conciencia entre los estudiantes de la importancia de la transferencia de embriones en el mejoramiento genético de un hato

Facilitar el método de aprendizaje por medio de los videos y las fotos que contiene el material didáctico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el centro de Cómputo de Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias con colaboración de la Unidad de Multimedia Institucional.

Recopilación de Datos

Luego de una amplia revisión bibliográfica se obtuvo la información más actualizada y real para que el estudiante pueda obtener material didáctico del trabajo, además se editó un video documental realizado por Elgin Breeding Service.

Por otro lado se recopilaron fotos y tablas que junto a las explicaciones hacen que el tema sea de fácil comprensión

Este CD fue realizado en Macro media, bajo la supervisión del Biól Miguel Ángel Arce Chávez de la Coordinación de Tecnologías para el Aprendizaje

GUIÓN

1 Organización y desarrollo de la transferencia de embriones (ET)

La ET se introdujo en Alemania en 1974 de manera experimental. Ha sufrido hasta ahora críticas muy variadas y será juzgada de manera contradictoria también en el futuro. Ninguna de las técnicas biológicas instauradas hasta ahora en la clínica entra una carga emocional tan grande como la ET, condicionada a su vez por la esperanza de éxito en muchos pasos, desde la sincronización previa, pasando por la superovulación, inseminación, hasta la recogida de los embriones y su transferencia, esperanzas de éxito que en algunos casos superan en mucho todas las previsiones y que frecuentemente no nos satisfacen en lo mas mínimo. Por termino medio, se puede considerar normal la obtención de alrededor de 10 embriones de diferente calidad, con una media de 6 embriones transferibles por lavado e inseminación artificial (I.A.).

En un principio parecía que la transferencia de embriones nunca superaría la fase experimental al tener en su contra el gran despliegue de trabajo técnico necesario (ET quirúrgico). Pese a ello, muchos criadores se decidieron a probar la ET, al menos, una primera vez pero, con la instauración de la cuota lechera en el año 1984, parecía avvicinarsi el adiós definitivo. Pese a todo y sin embargo, la recesión económica de los últimos años en el sector agrícola y ganadero no ha puesto en duda la transferencia de embriones y por lo tanto, es de esperar que mejoras en su metodología como, por ejemplo, la transferencia directa (DT), conlleven una reducción de los costes y una mayor difusión.

La organización de los programas de ET comienza con la simplificación de la conservación de los embriones para su almacenaje. Allí donde se han hecho ya todos los preparativos y ya se ha desarrollado un equipo de ET, de lo que se trata, es de conseguir un buen rendimiento en el trabajo. El veterinario de la explotación junto con el ganadero lleva a cabo los preparativos y el equipo de ET realizara la recogida y conservación de embriones para su transferencia directa. Una parte de los embriones se implantan en fresco y los embriones conservados se transfieren en otro momento, ya sea por el veterinario o por un técnico de ET, después de un celo natural (siete días tras la detección de celo o bien cinco días después del sangrado si no se ha visto el celo).

Así se difunde cada vez con mayor amplitud la transferencia de embriones desapareciendo el requisito de que su realización sea monopolizada exclusivamente por estaciones de ET o por equipos altamente especializados. Esto trae ingresos extras al veterinario y a los técnicos inseminadores con autorización para ET, origina competencia y con ello, una evolución de los precios según las premisas de una economía de libre mercado.

Durante la preparación de los programas de ET aparecen a menudo condiciones desfavorables tanto para la donante como para las receptoras que si no se previenen y reconocen a tiempo perjudicaran mucho el resultado. Errores evitables (cambios innecesarios de patios o establos, cambios en la ración, fallos en la aplicación de inyecciones, confusión de medicamentos) y patologías clínicas repentinas (mastitis,

cojeras, celos prematuros) conducen fácilmente al fracaso, razón por la que se los debe tener debidamente en cuenta.

2. Medidas de higiene durante la realización de la ET

Entre los requisitos para la concesión de la Autorización Nacional de la Ganadería y para el reconocimiento europeo de las instalaciones de recogida de embriones, ya sean ambulantes o estacionarias, se van concretado unas exigencias mínimas referentes a las instalaciones (laboratorio y otros sectores), al aparataje (instrumentos, aparatos de laboratorio etc.), al personal cualificado (veterinario y técnicos autorizados) y a la higiene (limpieza y desinfección de los aparatos y ropas adecuadas).

Esta claro que se debe evitar especialmente la propagación de enfermedades infectocontagiosas. Sin embargo, en la puesta en práctica de los programas de ET ocurre frecuentemente que, por un lado, una higiene excesiva minimiza la eficiencia del programa y, por otro, que en situaciones problemáticas se llega a descuidar la higiene considerablemente. Y situaciones problemáticas aparecen muy fácilmente, sobre todo en la ET ambulante, cuando ante incidentes, se debe improvisar y sustituir el protocolo acostumbrado de trabajo. Ocasionalmente el olvido de aparatos o no llevar una cantidad suficiente de ellos nos pone en una situación embarazosa a pie de explotación lo que nos obliga a improvisar durante la ET. suficiente instrumental, convenientemente organizado y empaquetado por bloques (ver lista de material) nos evitara sorpresas desagradables y fracasos innecesarios.

Para la organización y desarrollo de programas de transferencia de embriones, según los requisitos higiénicos exigidos, es necesario dividir el proceso en un área limpia y otra área sucia, también se habla de sector blanco y sector negro. La parte sucia engloba todo el manejo de animales, la recogida de los embriones y su transferencia mientras que todas las operaciones que se realizan con los embriones se efectúan en otra zona separada. Por lo tanto, todo el instrumental del sector sucio se debe limpiar someramente tras su uso y mantener siempre separado del área limpia hasta la finalización del protocolo de ET.

La limpieza y desinfección de los aparatos reutilizables (sondas de lavado, catéter de transferencia, artículos de plástico y de cristal) comienza con un lavado manual exhaustivo o con un tratamiento de ultrasonidos. La limpieza del instrumental con ultrasonidos es más completa y cuidadosa que el lavado manual del mismo. Tras su lavado los instrumentos y aparatos se deben enjuagar con abundante agua destilada y desionizada, para evitar que restos resacos de detergente o de sales disueltas en el agua se resolubilen en su próxima utilización y puedan dañar los embriones.

Después, lo mas sencillo es que las sondas de lavado y artículos de plástico (placas de Petri, jeringuillas y filtros de embriones) se esterilicen con gases tras su lavado (por ej., oxido de etileno), siempre que no se trate de elementos de un solo uso. Para ello los instrumentos a esterilizar se deben gasear, siguiendo las indicaciones del fabricante, correctamente envueltos en envoltorios especiales, permeables a los gases y después introducirlos en una secadora con corriente de

aire a 50-60°C o bien, simplemente, dejarlos a temperatura ambiente. Los artículos de metal y de vidrio tras su lavado y aclarado se esterilizan en el esterilizador durante una hora a 150-200°C. Las probetas se esterilizan en posición horizontal para evitar que queden restos de agua en su interior pues con las oscilaciones de temperatura (energía de evaporación) pueden originarse tensiones y rupturas en el vidrio.

El instrumental axial esterilizado se envuelve por separado. El material de vidrio se envuelve en papel de aluminio tras su esterilización mientras que el de metal (catéteres de transferencia, agujas de implantación) se empaqueta preferentemente y por separado en camisas sanitarias de plástico y se preserva estéril hasta su reutilización.

La realización de programas de ET bajo condiciones muy limitantes, como imperan frecuentemente en los países en vías de desarrollo, donde se carece, tanto de una autoclave, como de un esterilizador por gases, hace necesario esterilizar los instrumentos con agua hirviendo y soluciones desinfectantes suaves.

Al agua destilada se le añade una concentración de 0,5 a 2%, según las indicaciones del fabricante, del líquido de desinfección (por ej., Hexaquart[®]), se hierve el instrumental durante una hora, se enjuaga con agua destilada, se deja secar y se envuelve. La cocción del material es una técnica anticuada pero es válida como solución en caso de emergencia.

Los instrumentos que tras su uso, con el tiempo, sufren un cambio de color o de consistencia (sondas de lavado que se vuelven rígidas y quebradizas o blandas y pegajosas) o se han tratado erróneamente durante su lavado y esterilización o se han desgastado. No deben volver a utilizarse por razones de seguridad.

El mantenimiento y la limpieza del instrumental se pueden mejorar con la administración de silicona en las superficies de lavado. La aplicación de silicona tiene la ventaja de que gracias al efecto hidrófobo de la misma evita la fijación de partículas a la superficie del material y la capacidad de deslizamiento se ve incrementada. El material de vidrio se rocía con una emulsión de silicona al 0,5-1% y luego se calienta. Para ello se limpian los instrumentos de cristal, se aclaran con agua destilada, se sumergen en la emulsión de silicona y, tras escurrirlas, se calientan durante dos horas en el esterilizador a 260°C (también son suficientes tratamientos de 15 a 20 minutos a 300°C o 10 minutos a 330°C).

3. Animales Donantes

Como donantes son validas todas aquellas vacas adultas que no presenten ningún problema de tipo ginecológico. En ultima instancia se pueden incluir en la ET animales que poseen, como minimo, las condiciones anatomicofisiologicas requeridas, esto es, deben presentar ciclos regulares y posibilitar la palpación rectal.

3.1 Selección

La selección de las donantes depende de los objetivos del programa y de los requerimientos que deban cumplir desde el punto de vista biotecnológico y zootécnico. Especialmente aptos para ello son animales que hayan parido de dos a tres veces, que hicieran celos regulares tras un puerperio normal y que presenten un buen estado general.

Las novillas no suelen ser, en determinados casos, donantes óptimos, puesto que el paso del catéter de lavado a través del cervix entra una mayor dificultad en comparación con las vacas. En el pasado la calidad embrionaria en novillas superovuladas también era inferior a la de vacas adultas. Sin embargo este inconveniente se ve compensado por los últimos productos de FSH (Ovagen® y Folltropin®). Esto ha adquirido, entretanto, una gran importancia porque novillas con una buena genealogía y un valor productivo estimado alto aceleran la mejora genética mucho más como donantes (intervalo generacional más corto) que vacas mayores con datos productivos evaluados completos y valores productivos absolutos.

Antes de inducir la superovulación se debe comprobar la identidad de la donante.

En caso de que no exista una tarjeta de identificación de su grupo sanguíneo se le extraerá una muestra de sangre y se determinará el mismo. Para que una

novilla se pueda inscribir oficialmente como animal descendiente, fruto de la ET, se requiere la comprobación total de su parentesco mediante los grupos sanguíneos. En el caso de utilizar espermatozoides de diferentes toros para el celo superovulatorio se debe comprobar si el semen a usar hará posible después que se determine la procedencia de los descendientes en base a los factores sanguíneos.

3.1.1 Selección desde el punto de vista zootécnico

Para la selección de las donantes desde el punto de vista zootécnico es determinante el objetivo de mejora propuesto. Dicho objetivo está definido para cada raza pero a menudo se especifica de modo diferente en las distintas regiones. Los programas de ET son demasiado costosos y trabajosos para la reproducción de animales mediocres o para la reproducción normal de la propia explotación.

Objetivos de mejora en la instauración de la ET son los siguientes:

- la reproducción de animales de alta producción y elevado valor reproductivo (Fig. 4.1 pdg. 131),
- la predominancia de un carácter de mejora determinado mediante su rápida propagación,
- la conservación de embriones para la exportación e importación,
- el descubrimiento de caracteres hereditarios en líneas sanguíneas y/o maternas,
- eliminación de caracteres de una población,
- ampliación de la base genética en poblaciones pequeñas,
- mantenimiento de razas en extinción mediante la confección de reservas

genéticas,

- tratamiento para animales de alto valor genético con problemas de esterilidad adquirida,
- salvar las medidas higiénicas y epidemiológicas.

En la selección de las donantes desde el punto de vista de la mejora genética existen, a menudo, diferentes criterios de carácter regional dentro de una misma raza que dependen, a su vez, de las particularidades económicas de dicha región. Este es el caso especialmente de las razas de aptitud mixta. Mientras que, por ejemplo, en la raza Fleckvieh, en la antigua RFA, se exigen, además de unos requisitos en cuanto a tipo, morfología, musculatura y ubre, unos requerimientos muy altos referentes a la producción y a composición de la leche, en otros países no europeos la producción láctea es de menor relevancia para la mejora de esta raza. En dichos países, estos animales se crían y se mantienen principalmente para la producción de carne. De todo esto se deduce que, a menudo, la selección de vacas donantes se supedita al juicio subjetivo de personas que, aparte de los objetivos de mejora establecidos, pretenden los que ellos mismos consideran. La especulación juega un papel muy importante si se efectúa la inseminación artificial con un material genético especialmente valioso proveniente de otra población con el que el avarice de la mejora se debiera acelerar notablemente, como es el caso del semen de toros Holstein-Frisian provenientes de Norteamérica con el que se insemna en Europa y en otros continentes. Dentro de la mejora de Holstein es de especial interés en todo el mundo la producción Láctea axial como el contenido en leche de grasa y fundamentalmente de proteínas.

3.1.2 Selección desde el punto de vista biotecnológico

La selección desde el punto de vista biotecnológico implica una revisión veterinaria general y ginecológica para comprobar si el animal es idóneo o no como donante. Únicamente se pueden aceptar animales sanos. Vacas de rebaños fértiles y con un buen manejo (alimentación y mantenimiento), de parto sin dificultades y puerperio normal, con un periodo entre partos e índice de inseminaciones por preñez bajo, que muestran un celo, como más tarde, 4 semanas posparto y que, tras dicho celo, presentan ciclos regulares son las más adecuadas.

Animales cuyo estado general se encuentra afectado de alguna manera (caquexia, diarrea, cojeras) y aquellos que tras un puerperio problemático presentan un estado ginecológico anormal (retraso de la involución uterina, endometritis, vaginitis, ninfomanía, distrofia ovárica, urovagina, prolapso uterino y/o vaginal, mastitis) no valen como donantes y se deben rechazar consecuentemente. En las vacas de cría de manejo en extensivo con terneros mamando se debe tener en cuenta que la reproducción de las mismas se ve afectada por el anestro de lactación y por influencias estacionales. Estos animales presentan, por lo general, un intervalo parto-primer celo más prolongado.

Donantes que por padecer determinadas carencias se hayan declarado no aptas para la ET pueden ser superovuladas y lavadas tras un tratamiento veterinario tras el que se instauren ciclos estrales de carácter regular. Especialmente eficaz se

considera tratar a estos animales no solo sintomáticamente sino también de manera global, puesto que, en la mayoría de los casos, esos trastornos adquiridos de la reproducción son consecuencias de un estrés ambiental multifactorial que no puede llegar a ser compensado por el individuo que reacciona mostrando problemas de esterilidad de carácter funcional.

3.2 Medidas para la recuperación de donantes enfermos

El metabolismo de las donantes tiene una influencia directa sobre la reproducción. axial por ejemplo, una descompensación entre producción y alimentación, fundamentalmente un déficit energético y un excedente proteico, conduce a un metabolismo catabólico con balance energético negativo y niveles altos de urea que, según la gravedad de la descompensación, se puede manifestar de modo subclínico o, incluso, sintomático provocando esterilidad. Antes de utilizar las donantes que presenten alteraciones ginecológicas o generales debe tratárselas convenientemente. Los animales con alteraciones de carácter general se deben aislar del rebaño, tratar con vitaminas, minerales, microminerales, protectores hepáticos y compensarles las carencias que pudieran haber estado sufriendo. La recuperación de estos animales se ve acelerada si se les traslada a un ambiente óptimo para ellos (patio de parideras, pastos cercanos a la explotación con seguimiento individual) donde mantengan el contacto con animales de su especie sin empeorar su bienestar.

Para el tratamiento sintomático de las principales causas de esterilidad se aconsejan los siguientes protocolos de tratamientos:

Endometritis

- Prostaglandina F_{2a} para el drenaje y limpieza del útero,
- lavado uterino a los 5 ó 6 días con un preparado yodado (por ej., Prolugol[®]) en combinación con - GnRH (por ej., 0,2 mg Buselerin[®] i.m.) o HCG (5.000 u.i. i.v.) para inducción y estabilización del ciclo.

Según cada caso repetición del tratamiento a los 14 días.

Anestro provocado por un cuerpo luteo persistente.

- Prostaglandina F_{2a} el día de la exploración. - Vitaminas, minerales y microminerales i.m.

Anestro provocado por ausencia de actividad ovárica y ninfomanía

- El día de la exploración de 3.000 a 5.000 u.i. de HCG i.v. y - vitaminas, minerales y microminerales i.m. o
- una dosis efectiva de GnRH (por ej., 4 x 0,01 mg Buselerin[®]) durante cuatro días consecutivos y
- al menos una administración única de vitaminas, minerales y microminerales.

Exploración ovárica poco clara y diagnostico de carácter dudoso

- Prostaglandina F_{2a} el día de la exploración y
- en el siguiente celo GnRH para inducir la ovulación.

En el caso de que no hayan manifestado el celo el día 5° tras la prostaglandina F_{2a} se administrara HCG o GnRH de manera análoga al tratamiento del anestro por ausencia de actividad ovárica.

3.3 Manejo y preparación

En la preparación de los programas de ET hay que tener en cuenta que se deben conservar los animales donantes en su ambiente normal, desde la inducción de la superovulación hasta el lavado y recogida de los embriones evitándose situaciones extraordinarias que desencadenen estrés como presentación a exposiciones y concursos. Si para la realización de la ET es inevitable que se efectúe un cambio de establo, se llevará a cabo de 2 a 4 semanas antes de comenzar con la superovulación para que tenga un tiempo de adaptación al lugar definitivo.

Ya se ha demostrado en el pasado que un cambio de patios de la donante con el consecuente estrés social que sufre el animal es, a menudo, la causa de fracaso en la ET, de la misma manera que también lo son cambios transitorios como la estabulación desde los pastos o prados a establos nuevos o estabulación en establos extraños en caso de compra o de reunir varios individuos donantes de diferentes rebaños. Cualquier cambio (incluso dentro de la misma explotación o un cambio de alimentación) implica la necesidad de un tiempo de adaptación para el animal cuya duración varía individualmente. La introducción en un nuevo ambiente, que incluye luchas para la instauración del rango social y otros factores estresantes (establo, tratamientos, clima) desencadena un síndrome de adaptación que provoca esterilidad. En situaciones límites de estrés se bloquea en la vaca la reproducción puesto que la propia supervivencia es más relevante en ese momento que la propagación de la especie. Animales estresados no responden a los

tratamientos hormonales para inducir la superovulación independientemente del producto o la dosis aplicada.

La condición básica para la buena reacción de un animal a los tratamientos hormonales es un bienestar del mismo. Situaciones de manejo esporádicas como sujeción para la inyección o la inseminación artificial son incensivas. Pero cualquier práctica de manejo prolongada en el tiempo que estrese al animal se debe evitar también tras la superovulación, puesto que interfiere en el desarrollo normal de los embriones.

3.4 Sincronización previa

Para la planificación y organización de un programa de ET, donde se incluyen varias donantes, es indispensable confeccionar previamente un plan de sincronización, según el cual las hembras serán sincronizadas con una variación de ± 3 días y los celos de las donantes a nuestra disposición deben de presentarse con una diferencia temporal de menos de 7 días entre ellos. La sincronización previa de 4 a 5 vacas donantes para un programa de ET es lo ideal porque, por un lado, tenemos la seguridad de no salir con las manos vacías aunque falle una u otra y, por el otro, el lavado de 5 animales con las transferencias y/o la crioconservación de los embriones obtenidos es factible a lo largo de un día.

La sincronización se puede realizar como pronto 4 semanas posparto, en caso de vacas, siempre y cuando hayan mostrado previamente un primer celo natural tras el parto y no presenten ninguna anomalía de tipo ginecológico. que las haga

rechazables como donantes. Para concretar la fecha de la sincronización nos debemos atender lo mas posible al ciclo del animal, siempre que no haya de por medio días festivos u otros eventos que nos afecten. axial pues los animales que hayan presentado celos muy cercanos en el tiempo (dispersión < 7 días) se dejan y los celos de los animales restantes se sincronizan, ya sea mediante una prolongación del ciclo con progestagenos (espirales o implantes subcutáneos) o acortando el mismo mediante prostaglandina F_{2a} . Es aconsejable administrar HCG o GnRH durante el celo para inducir la ovulación y estabilizar el ciclo.

Un sistema efectivo de sincronización de las donantes para ET es el de la <<Espiral-PRID>>. Consiste en implantar la espiral intravaginalmente a todos los animales 39 días antes de la fecha prevista para la ET, independientemente del día del ciclo en que se encuentren. Doce días después se extrae la espiral y se administra prostaglandina F_{2a} . Tres días después aproximadamente todos los animales mostrarán celo y en ese momento se les aplica GnRH o HCG para inducir la ovulación y estabilizar el ciclo.

3.5 Superovulación

La superovulación consiste en la estimulación hormonal de la donante para la formación y desarrollo de varios folículos y su ovulación en ambos ovarios en un momento previamente fijado. La inducción de la superovulación se sucede en el diestro entre el día 8 y 14 del ciclo mediante la inyección de hormonas gonadotropas como la FSH, PMSG/anti-PMSG o HCG. El celo superovulatorio se provoca finalmente con prostaglandina F_{2a} .

La superovulación se puede inducir mediante la aplicación de una serie continuada de dosis decrecientes o iguales de FSH. La recogida de embriones presenta un resultado algo superior en el caso de series decrecientes, pero para equipos de ET no muy experimentados la aplicación de dosis diferentes es algo más engorrosa y la probabilidad de cometer un error en la dosificación es mayor. La inyección de dosis idénticas es más fácil.

Una condición esencial para obtener éxito en la superovulación es aplicar las hormonas en el instante adecuado. En el momento de la inducción de la superovulación, entre el día 8 y 14 del ciclo, debe poderse diagnosticar claramente por vía rectal un cuerpo luteo. El diagnóstico se puede comprobar, en casos dudosos, mediante la determinación del nivel de progesterona. Para ello se debe tomar una primera muestra de leche el día del último celo pre-superovulatorio y una segunda antes de la inducción de la superovulación. La amplitud del pico de progesterona que se sucede normalmente tras el celo se tomara en cuenta a la hora de decidir si se procede o no a la superovulación. Durante el estro los valores de progesterona en leche alcanzan valores siempre $<0,3$ ng mientras que en el diestro (momento donde se induce la superovulación) se ven, como mínimo, triplicados.

El ciclo de la vaca tiene una duración media de 21 días (17 hasta 24) y el celo de 24 horas. Las novillas están en celo de 12 a 24 horas menos que las vacas presentando estas últimas un estro de 24 a 36 horas. El comportamiento de celo

durante el estro superovulatorio se ve mas acentuado en todas sus facetas respecto al del celo natural, sin embargo, no siempre se muestra en el momento esperado o, a veces, no aparece, lo que desencadena diferentes consecuencias para la ET. Un adelanto de hasta 24 horas en la aparición del celo es de mejor pronostico que un retraso de la misma duración en el comienzo del estro. Un retraso de una a 6 horas es tolerable pero superado este intervalo de tiempo no hay apenas esperanzas de éxito. Por lo tanto es mejor ni tan siquiera inseminar a las donantes que presenten el comienzo del celo con un retraso así o que no lo muestren.

Las tasas de ovulación varían enormemente de un animal a otro e, incluso, en repeticiones de tratamientos en un mismo individuo, a pesar de utilizar las mismas hormonas e idénticas dosis. Determinados condicionantes del ambiente no identificados, la habitación del animal a los preparados gonadotropos utilizados (producción de anticuerpos) y la variante <<hombre>> son posibles causas de esta variabilidad. Se pueden obtener tasas de ovulación desde cero hasta 80 o mas, pudiéndose concretar dichos valores por el numero de cuerpos luteos presentes en el ovario. (Fig. 4.2, pag. 131). Estos casos extremos y excepcionales son indeseables en cualquier caso oscilando la tasa de ovulación óptima entre 10 y 15, puesto que el porcentaje obtenido de embriones vitales es el mejor.

3.5.1 FSH y prostaglandina F_{2a}

La mayoría de los preparados de FSH se obtienen a partir de hipófisis de cerdo, solamente Ovagen^o se extrae de hipófisis de ovino.

Debido a la vida media tan corta de la FSH se deben aplicar dosis consecutivas en intervalos de 12 horas. Protocolos de superovulación con una intensidad de tratamiento menor no suelen tener éxito. La superovulación con FSH se sucede, en el caso más sencillo, con 8 dosis idénticas en 4 días consecutivos (por ej., 5 mg o 1,0 ml FSH-P^{im} por vaca y 3,75 mg o 0,75 ml FSHpTM por novilla). También se han desarrollado protocolos de tratamientos con dosis decrecientes del preparado (Tabla 4.1). El día 4^o tras el comienzo del tratamiento se aplican, independientemente del tipo de FSH utilizado, dos dosis de prostaglandina F_{2a} (una por la mañana y otra por la tarde) para la inducción del celo.

Las dosis de los diferentes productos de FSH en mg pueden llevar a malentendidos y no son directamente comparables. Se dan referidos siempre a unos valores estándar del productor, lo que significa que, en realidad, el dato de los mg no nos dice nada directamente sobre la actividad del mismo. Por ello se han reunido en la tabla anterior los datos en ml de las dosis aconsejadas de los productos de FSH más usuales. Estos valores son efectivos siempre y cuando se cumpla la condición de haber diluido la totalidad del extracto liofilizado en todo el volumen de diluyente.

Tabla 4.1 Tratamientos de superovulación con diferentes productos

Días	1° Día de tratamiento		2° Día de treatment		3° Día de tratamiento		4° Día de tratamiento	
	mañana	tarde	mañana	tarde	mañana	tarde	mañana	tarde
FSH-P®% (Schering-Plough Animal Health)	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5
	1,5	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,3	0,3
(Vetrepharm, Canada Inc.)	3,0	3,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,0	2,0
	2,5	2,5	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0
ICP, Nueva Zelanda	3,5	3,5	2,5	2,5	1,5	1,5	1,0	1,0
	2,5	2,5	2,0	2,0	1,0	1,0	0,5	0,5
FSH-LH Sanofi-Ceva	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0	3,0	2,0	2,0
	4,5	4,5	3,5	3,5	2,5	2,5	1,5	1,5

- todos los valores se dan en ml del producto ya disuelto - Los valores en cursiva son válidos para novillas

Protocolos probados de superovulación con FSH 1

Hembra donante: Vaca

Presincronización (si es necesario):

El 1 de abril (1-04) dos aplicaciones de prostaglandina F_{2a}* mañana y tarde.

Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Vacas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa.

15-04	-mañana	Follitropin 3,0 ml
	-tarde	Follitropin 3,0 ml
16-04	-mañana	Follitropin 2,5 ml
	-tarde	Follitropin 2,5 ml
17-04	-mañana	Follitropin 2,5 ml
	-tarde	Follitropin 2,5 ml
18-04	-mañana	Follitropin 2,0 ml y prostaglandina F _{2a} *
	-tarde	Follitropin 2,0 ml y prostaglandina F _{2a} *
19-04	-mañana	exploración para comprobar la respuesta
20-04	-mañana	inseminación
	-tarde	inseminación y HCG**
21-04	-mediodía	inseminación
27-04		recogida de embriones y transferencia.

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

- 06-04 -primera dosis de prostaglandina F2a ***
- 17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis
de prostaglandina F2a

* 2 ml de Estrumate®/ Pronilen® o 5 ml de Illiren® i. m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton®/Gonagestrol®/Primogonyl® i. v. o 5 ml
de Receptal®/Fertagyl® i. m.

*** las receptoras que entran en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna
dosis de prostaglandina F2, el 06-04.

1 Hembra donante: *Novilla*

Presincronización (si es necesario):

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina F2a* mañana y tarde.

Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Novillas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa.

15-04	-mañana	Folltropin 2,5 ml
	-tarde	Folltropin 2,5 ml
16-04	-mañana	Folltropin 2,0 ml
	-tarde	Folltropin 2,0 ml
17-04	-mañana	Folltropin 1,5 ml
	-tarde	Folltropin 1,5 ml
18-04	-mañana	Folltropin 1,0 ml y prostaglandina F2a*
	-tarde	Folltropin 1,0 ml y prostaglandina F2a*
19-04	-mañana	exploración para comprobar la respuesta
20-04	-mañana	inseminación
	-tarde	inseminación y HCG**
21-04	-mediodia	inseminación
27-04		recogida de embriones y transferencia.

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

06-04 -primera dosis de prostaglandina F2a ***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis

de prostaglandina F_{2a} **

* 2 ml de Estrumate[®]/Pronilen[®] o 5 ml de Illiren[®] i. m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton[®]/Gonagestrol[®]/Primogonyl[®] i. v. o 5 ml de Receptal[®]/Fertagyl[®] i. m.

*** las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna dosis de prostaglandina F₂ el 06-04.

1 Hembra donante: Vaca

Presincronización (si es necesario):

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina F_{2a}* mañana y tarde. Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**

Vacas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa.

15-04	-mañana	Ovagen 3,5 ml
	-tarde	Ovagen 3,5 ml
16-04	-mañana	Ovagen 2,5 ml
	-tarde	Ovagen 2,5 ml
17-04	-mañana	Ovagen 1,5 ml
	-tarde	Ovagen 1,5 ml
18-04	-mañana	Ovagen 1,0 ml y prostaglandina F _{2a} *
	-tarde	Ovagen 1,0 ml y prostaglandina F _{2a} *
19-04	-mañana	exploración para comprobar la respuesta
20-04	-mañana	inseminación
	-tarde	inseminación y HCG**
21-04	-mediodía	inseminación
27-04		recogida de embrones y transferencia.

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

06-04 -primera dosis de prostaglandina F_{2a}.***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis de prostaglandina F_{2a}

* 2 ml de Estrurnate[®]/ Pronilen[®] o 5 ml de Illiren[®] i. m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton[®]/Gonagestrol[®]/Primogonyl[®] i. v. 0 5 ml de Receptal[®]/Fertagyl[®] i. m.

*** las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna dosis de prostaglandina F_{2a} el 06-04.

1 Hembra donante: Novilla

Presincronización (si es necesario):

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina F_{2a}* mañana y tarde.

Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Novillas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa.

15-04	-mañana	Ovagen 2,5 ml
	-tarde	Ovagen 2,5 ml
16-04		
	-tarde	Ovagen 2,0 ml
17-04		
	-tarde	Ovagen 1,0 ml
18-04		
	-tarde	Ovagen 0,5 ml y prostaglandina
19-04		
20-04	-mañana	inseminación
	-tarde	inseminación y HCG**
21-04		
27-04		recogida de embriones y

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

06-04 -primera dosis de prostaglandina F_{2a}.***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis de prostaglandina F_{2a}

• 2 ml de Estrumate[®]/ Pronilen[®] o 5 ml de Illiren[®] i. m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton[®]/Gonagestrol[®]/Primogonyl[®] i. v. o 5 ml de Receptal[®]/Fertagyl[®] i. m.

***Las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna dosis de prostaglandina F_{2a} el 06-04.

3.5.2 PMSG y prostaglandina F_{2a}

PMSG tiene una vida media de 8 a 14 días, razón por la cual, una única aplicación es suficiente para inducir la superovulación. La desventaja de este método es que el efecto superovulatorio de esta hormona continua existiendo una vez pasado el celo superovulatorio perjudicando el desarrollo de los embriones. Por ello es conveniente neutralizar la larga actividad de la PMSG mediante la administración de un suero anti-PMSG en el momento del celo.

Para inducir la superovulación en vacas con PMSG se aconseja el siguiente protocolo:

- 2.500 u.i. de PMSG

- 60 h. después prostaglandina F_{2a}

- 12 h. después otra dosis de prostaglandina F_{2a}

- Celos de 36 a 48 h. tras la primera dosis de prostaglandina F_{2a} - 750 u.i.

de anti-PMSG con la segunda inseminación

En el caso de novillas se induce la superovulación con 1.500 hasta 2.000 u.i. de PMSG y 450 hasta 600 u.i. de anti-PMSG bastan para limitar su efecto. El resto es análogo a la superovulación en vacas.

Protocolos de superovulación con PMSG

1 Hembra donante: Vaca

Presincronización (si es necesario):

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina F_{2a}* mañana y tarde.

Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Vacas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa. 15-

- 04 -tarde 2.500 u.i. PMSG
- 18-04 -mañana prostaglandina F_{2a}*
- tarde prostaglandina F_{2a}*
- 19-04 -mañana exploración para comprobar la respuesta
- 20-04 -mañana inseminación
- tarde inseminación y 750 u.i. anti-PMSG
- 21-04 -medio día inseminación
- 27-04 recogida de embriones y transferencia.

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

- 06-04 -primera dosis de prostaglandina F_{2a}***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis de prostaglandina $F_{2\alpha}$.

* 2 ml de Estrumate[®]/Pronilen[®] o 5 ml de Iliren[®] i. m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton[®]/Gonagestrol[®]/Primogonyl[®] i.v. c 5 ml de Receptal[®]/Fertagy[®] i.m.

*** las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna dosis de prostaglandina $F_{2\alpha}$, el 06-04.

1 Hembra donante: Novilla

Presincronización (si es necesario):

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina $F_{2\alpha}$ * mañana y tarde. Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Novillas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa.

15-04 -tarde de 1500 a 2000 u.i. de PMSG

18-04 -mañana prostaglandina $F_{2\alpha}$ *

-tarde prostaglandina $F_{2\alpha}$ *

19-04 -mañana exploración para comprobar la respuesta

20-04 -mañana inseminación

-tarde inseminación y 450 hasta 600 u.i. de anti-PMSG

21-04 -medio día inseminación

27-04 recogida de embriones y transferencia.

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante).

06-04 -primera dosis de prostaglandina F_{2a}***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis
de prostaglandina F_{2a}

* 2ml de Estrumate[®]/Pronilen[®] o 5ml de Illiren, i.m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton[®]/Gonagestrol[®]/Primogonyl[®] i. v. o 5ml
de Receptal[®]/Fertagyl[®] i.m.

*** las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna
dosis de prostaglandina F_{2a}, el 06-04.

3.5.3 HMG y prostaglandina F_{2a}

Los preparados de HMG son muy caros en comparación con los de las otras gonadotropinas (FSH o PMSG) por lo que tan solo se utilizan para la superovulación del bovino cuando los tratamientos con las anteriores hormonas no son efectivos. En algunas donantes superovuladas varias veces con PMSG o FSH se observa a veces la producción de anticuerpos y no se produce respuesta al tratamiento. En este caso la estimulación con HMG puede tener éxito.

La superovulación con HMG se lleva a cabo de modo análogo a la de FSH mediante una serie de aplicaciones consecutivas. Sin embargo, al contrario que ocurre con la FSH, en el caso de HMG el protocolo más efectivo es el que utiliza dosis decrecientes cada 12 horas.

Protocolos de superovulación con HMG

1 Hembra donante: Vaca

Presincronización (si es necesario)

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina F_{2a}* mañana y tarde

Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Vacas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa

- | | | |
|-----|-----------|---|
| 15- | -tarde | HMG (375 u.i. FSH) |
| 16- | -mañana | HMG (300 u.i. FSH) |
| | -tarde | HMG (300 u.i. FSH) |
| 17- | -mañana | HMG (300 u.i. FSH) |
| | -tarde | HMG (300 u.i. FSH) |
| 18- | -mañana | HMG (300 u.i. FSH) y prostaglandina F _{2a} |
| | -tarde | HMG (225 u.i. FSH) y prostaglandina F _{2a} |
| 19- | -mañana | exploración para comprobar la respuesta |
| 20- | -mañana | inseminación |
| | -tarde | inseminación y HCG** |
| 21- | -mediodía | inseminación |
| 27- | | recogida de embriones y transferencia. |

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

06-04 -primera dosis de prostaglandina F_{2a}***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis
de prostaglandina F_{2a}

* 2 ml de Estrumate®/Pronilen® o 5 ml de Illiren® i.m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton®/Gonagestrol®/Primogonyl® i.v. o 5 ml de Receptal®/Fertagyl® i.m.

*** Las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna dosis de prostaglandina F_{2a} el 06-04.

1 Hembra donante: Novilla

Presincronización (si es necesario):

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina F_{2a}* mañana y tarde.

Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Novillas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son validas para el programa.

15-04	-tarde	HMG (275 u.i. FSH)
16-04	-mañana	HMG (225 u.i. FSH)
	-tarde	HMG (225 u.i. FSH)
17-04	-mañana	HMG (225 u.i. FSH)
	-tarde	HMG (225 u.i. FSH)
18-04	-mañana	HMG (200 u.i. FSH) y prostaglandina F _{2a}
	-tarde	HMG (200 u.i. FSH) y prostaglandina F _{2a}
19-04	-mañana	exploración para comprobar la respuesta
20-04	-mañana	inseminación
	-tarde	inseminación y HCG**
21-04	-medio día	inseminación
27-04		recogida de embriones y transferencia.

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

06-04 -primera dosis de prostaglandina F_{2a}***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis
de prostaglandina F_{2a}

* 2 ml de Estrumate®/Pronilen® o 5 ml de Illiren® i.m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton®/Gonagestrol®/Primogonyl® i.v. o 5
ml de Receptal®/Fertagyl® i.m.

*** las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna dosis de prostaglandina F_{2a} el 06-04.

1 Hembra donante: Novilla

Presincronización (si es necesario):

El 1 del 4 dos aplicaciones de prostaglandina F_{2a}* mañana y tarde.

Durante el celo, si es posible, una dosis de HCG**.

Novillas con celos entre el 1 y el 7 del 4 son válidas para el programa.

15-04	-tarde	HMG (275 u.i. FSH)
16-04	-mañana	HMG (225 u.i. FSH)
	-tarde	HMG (225 u.i. FSH)
17-04	-mañana	HMG (225 u.i. FSH)
	-tarde	HMG (225 u.i. FSH)
18-04	-mañana	HMG (200 u.i. FSH) y prostaglandina F _{2a}
	-tarde	HMG (200 u.i. FSH) y prostaglandina F _{2a}
19-04	-mañana	exploración para comprobar la respuesta
20-04	-mañana	inseminación
	-tarde	inseminación y HCG **
21-04	-medio día	inseminación
27-04		recogida de embriones y transferencia

2 Hembras receptoras (aprox. 5 por donante)

06-04 -primera dosis de prostaglandina F_{2a}***

17-04 -por la tarde o el 18-04 por la mañana segunda dosis
de prostaglandina F_{2a}

* 2 ml de Estrumate®/Pronien® o 5 ml de Illiren® i.m.

** por ejemplo, 3-5.000 u.i. de Ekluton[®]/Gonagestro[®]/Primogonyl[®] i.v. o 5 ml de Receptal[®]/Fertagy[®] i.m.

*** las receptoras que entren en celo del 30-03 al 11-04 no necesitan ninguna dosis de prostaglandina F_{2a} el 06-04.

3.6 Inseminación de las hembras donantes

Normalmente las donantes muestran celo de 36 a 48 horas tras la aplicación de la prostaglandina F_{2a}. Debido a que las ovulaciones tienen lugar en momentos diferentes en un intervalo de tiempo amplio es necesario inseminar tres veces consecutivas cada 12 horas.

Si la superovulación se ha inducido con FSH o HMG es conveniente aplicar en el momento de la 2ª inseminación de 3.000 a 5.000 u.i. de HCG para reducir algo el intervalo de tiempo en el que se suceden las ovulaciones. A los animales que se haya superovulado con PMSG se les administra antiPMSG en el momento de la 2ª inseminación sin requerirse la segunda aplicación de HCG, como en el caso de la superovulación con FSH o HMG.

La inseminación se debe realizar con especial atención puesto que la inseminación repetida del animal aumenta el riesgo de contaminación por germen, lo que disminuiría o anularía totalmente el éxito de la ET. También se debe evitar la exploración de los ovarios y de los folículos durante la misma porque conducen fácilmente a la ruptura de los folículos preovulatorios (Fig. 4.3 pag. 132). Los

ovocitos procedentes de ovulaciones así provocadas son inmaduros.

Es posible tener éxito con tan solo dos inseminaciones si se programan dependiendo del comportamiento del animal donante (del comienzo del celo y de su duración), debiéndose llevar a cabo la primera inseminación de 8 a 10 horas tras el comienzo del celo y 10 a 14 horas después la segunda.

En el caso de inseminaciones con más de un toro se debe aclarar de antemano si las características de los grupos sanguíneos de los mismos permitirá la diferenciación genética de la descendencia.

4. Animales Receptores

Toda novilla adulta desde el punto de vista sexual y sin patologías reproductivas, así como toda vaca sana y sin trastornos ginecológicos puede ser tomada como hembra receptora.

4.1 Selección general

Una selección desde el punto de vista genético en las receptoras no tiene mucho sentido, aun cuando no se puede descartar del todo una influencia materna de la receptora sobre los embriones y su desarrollo. Sin embargo, la experiencia ha demostrado una patente influencia del medio ambiente sobre las tasas de implantación y desarrollo de los embriones transferidos. Receptoras

mantenidas con un buen manejo acogen mejor los embriones y llevan a término terneros más vitales y de mayor peso que aquellas que sufren un manejo deficiente y una mala alimentación.

La selección desde el punto de vista veterinario de las receptoras en un rebaño cerrado se limita a la exploración del estado general y a comprobar la ausencia de patologías ginecológicas que puedan interferir en la ET. El objetivo de la exploración ginecológica es rechazar animales con anomalías (por ej., órganos sexuales juveniles, hermafroditismo) o con algunas patologías (por ej., aciclia, ninfomanía, endometritis).

Receptoras que provienen de diferentes rebaños deberán explorarse según el estado higiénico del rebaño del que proceden, en determinados casos internarse en cuarentena y analizarse enfermedades infectocontagiosas (leucosis, brucelosis, tuberculosis, BHV1, BVD) antes de aceptarlas como receptoras.

En caso de sospecharse una posible infección con BVD es conveniente una doble vacunación 6 y 2 semanas antes de la transferencia embrionaria.

La selección definitiva de la receptora se lleva a cabo el mismo día de la implantación, dependiendo de determinados datos (momento de entrada en celo, duración e intensidad del mismo) y del resultado de la exploración ginecológica en ese momento (cuerpo luteo y estado del útero).

4.2 Alimentación y manejo

La alimentación y manejo de las receptoras es algo menos crítica que la de las donantes pero no se debe menospreciar en absoluto. Un aporte suficiente de minerales, microminerales y vitaminas previo a la implantación embrionaria es muy importante para la fertilidad, existiendo una estrecha relación entre la alimentación y el manejo y el éxito en las transferencias. La fertilidad es junto con el estado de salud y la productividad, una reacción orgánica condicionada fuertemente por el medio ambiente, así pues un mal manejo (superpoblación, aporte nutricional deficiente, intoxicaciones alimentarias, etc.) son irregularidades que hacen fracasar el complejo mecanismo de la reproducción.

Manteniendo y preparando a las receptoras en buenas condiciones medio-ambientales se mejoran las tasas de preñez en comparación a cuando sufren cuidados deficientes o mediocres. Las tasas de preñez varían entre un 40 y un 90% en estrecha relación con las condiciones del medio. Sin embargo, en determinados casos, se obtienen unos resultados de transferencias muy malos a pesar de que el manejo de las receptoras es óptimo sin existir razón lógica para el fracaso, así como también, a veces, en condiciones muy deficientes de mantenimiento se pueden obtener buenos resultados tras la implantación, siendo esto igualmente inexplicable.

Los mejores resultados de transferencia se alcanzan, con diferencia, cuando las receptoras (preferentemente novillas) se mantienen en grupo y sin sufrir ninguna

variación en el manejo. Cambios de establos traen consigo un estrés de adaptación, flujos de población conllevan inestabilidad en el sistema social (jerarquías y dominancias en el rebaño), y cambios en la alimentación provocan alteraciones metabólicas. Es preferible que las receptoras no estén muy gordas pero ya durante la preparación para la ET y, al menos, los 14 días previos a la transferencia deben tener un metabolismo predominantemente anabólico y, por lo tanto, estar ganando peso. Según muestra la experiencia los embriones se implantan mejor con un balance metabólico positivo. La anidación es el día 18 del ciclo, el día 1 posterior a la transferencia. Tras este periodo se considera superada la fase más crítica de la ET.

4.3 Sincronización

La sincronización del celo de las receptoras se puede inducir o bien con progestagenos (espirales-PRID o implantes subcutáneos) o con prostaglandina F_{2a}:

Lo más fácil es administrar a las receptoras de 20 a 21 días antes de la transferencia la primera inyección de prostaglandina F_{2a} (presincronización) y el día 9° antes de la ET se les administra la segunda dosis de prostaglandina F_{2a}, junto con la donante (sincronización).

Si se sincronizan con espirales-PRID o con implantes subcutáneos, la colocación de estos se lleva a cabo el día 20° (± 1 día) antes de la ET y se retiran el día 9° previo a la transferencia.

Si en el momento de la presincronización se conoce perfectamente el ciclo de las receptoras gracias a una observación meticulosa de los celos, se puede prescindir de la primera prostaglandina o de los progestagenos en animales que hayan entrado en celo del día 48 al 38 antes de la ET. Para la sincronización basta, en este caso, una Bola dosis de prostaglandina el día 9^a antes de la transferencia puesto que se encuentran ya en una fase del ciclo sensible a la misma.

Un método de sincronización alternativo al anteriormente descrito consiste en administrar la prostaglandina a las receptoras 12 horas antes de aplicársela a las donantes. Los animales receptores suelen presentar, por lo general, el celo inducido por prostaglandina F_{2α} algo más tarde que los tratados previamente con FSH o PMSG, lo que ayudan más a ajustar la sincronización entre donante y receptora.

En el momento del celo sincronizado, que será el día 6^o-7^o antes de la ET, se puede administrar GnRH a las receptoras para estimular la ovulación y estabilizar el ciclo. El hecho de que el celo de la receptora sea inducido por prostaglandinas o sea natural no influye en el resultado de la transferencia. Lo que es importante es que los animales muestren un celo patente en el momento adecuado, sincronizado con el de la donante y que en el momento de la transferencia presenten un cuerpo luteo fácilmente palpable y bien estructurado. Los mejores resultados de implantes se alcanzan, por lo tanto, en casos donde, el día de la transferencia, se dispone de datos exactos sobre el celo de cada una de las receptoras (comienzo, intensidad y duración).

El aprovechamiento de receptoras tras un celo natural no sincronizadas al día 7^o

(±1) para la transferencia de embriones congelados (TG) es perfectamente posible y adquiere cada vez mas importancia.

4.4 Selección especifica como receptora

La selección definitiva de las receptoras se lleva a cabo, finalmente, justo antes de la transferencia, según criterios ginecológicos. Se considera beneficioso, además, clasificar estos animales según su calidad como receptoras para coordinarlos mas fácilmente con los embriones, a su vez también, de diferentes calidades. así pues, se deben transferir a las mejores receptoras los mejores embriones, según criterios morfológicos, y los de menor vitalidad a las novillas peores. Por un lado, optimizaremos así la probabilidad de obtener preñeces con los embriones mejores y por otro, se hace posible el alcanzar alguna que otra preñez con los embriones más débiles.

Se considera una <<muy buena>> receptora aquella que mostró un celo patente y mas o menos simultaneo al de la donante, sin anormalidades ni patologías ginecológicas, con un buen cuerpo luteo el día de la transferencia y una consistencia uterina correspondiente al día del diestro en que se encuentra.

Las receptoras clasificadas como <<buenas>> serán aquellas que presentan todas estas características antes citadas pero en un intervalo de valores estrecho que se aparta algo del optimo.

Receptoras <<mediocres>> o aceptadas como receptoras *in extremis* son aquellas que

presentan un intervalo de valores, tras la exploración ginecológica, que se alejan bastante y en diferente medida del óptimo (por ej., cuerpo luteo no claramente palpable, cuerpo hiteo en coexistencia con folículos en el ovario, tono contraído de la matriz con presencia de un cuerpo luteo claro). Otra causa para clasificarlas en este grupo es que presenten celo con una asincronía con la donante superior a ± 24 horas.

Cuanto mayor sea la varianza con que los valores se alejan del óptimo y cuanto mayor sea el número de síntomas que lo hacen, menor calidad presenta el animal para ser receptor, hasta poder llegar a rechazarse categóricamente como integrante del programa de ET.

Este sistema de clasificación en gran medida subjetivo se puede objetivar algo mediante el test de progesterona. Sin embargo, la determinación sistemática de progesterona en todas las receptoras es demasiado costoso y carece de sentido práctico para los programas de ET.

La clasificación de las receptoras en <<muy buenas>>, «buenas», <<mediocres>> y «rechazables» se realiza de manera algo diferente dependiendo de la persona que realiza la exploración. Sin embargo no es de extrema importancia esta variabilidad que se hace mas patente en casos limite o dudosos cuando se trata de un punto más o menos, porque lo realmente prioritario es rechazar o aceptar al animal como receptor.

En el caso de profesionales experimentados la diferenciación de las receptoras en

aceptables (con uno, dos o tres puntos) y rechazables por medio de una exploración rectal es un método suficientemente seguro y sin discusión. Es conveniente escribir los puntos del animal con un marcador, en el momento de la exploración, en el flanco donde se encuentra el cuerpo luteo. Esto acelera y facilita la organización de las transferencias de los embriones en concordancia con su calidad y la de las receptoras y además nos informa del cuerno ipsilateral donde se deberá efectuar el implante.

En el caso de repetirse un programa de ET se pueden volver a utilizar hembras receptoras ya sincronizadas la vez anterior pero que no quedaron prefladas. Sin embargo, tras una segunda experiencia en que no queden gestantes es preferible no volver a intentarlo.

5. Recolección de Embriones

La recogida de embriones se realiza, preferentemente, el 7º día después de la primera inseminación mediante un lavado uterino transcervical.

El día 7º tras la primera inseminación es el día más conveniente para realizar el lavado puesto que es cuando los embriones son más fáciles de extraer y separar.

En ese momento se ubican en el extremo anterior del cuerno uterino y mediante el lavado son fácilmente arrastrados al exterior flotando en el medio. Además en ese momento los embriones se encuentran en el estadio de blastocisto o de m6rula.

fases muy estables, lo que hace posible que sean transferidos directamente o que sufran otras manipulaciones (como la congelación y la micromanipulación). En todo el mundo se ha establecido el recuperar los embriones el día 7º tras la primera inseminación lo que estandariza la valoración y manipulación de los mismos para su comercialización y facilita la sincronización de las receptoras. Una exploración rectal de los ovarios nos orienta sobre el posible número de embriones que podremos recoger, según el número de cuerpos luteos palpables.

5.1 Extracción de los embriones

La recogida no quirúrgica o lavado de los embriones se realiza a través de la vagina, bajo control rectal y con el animal en estación. Tiene una duración de 15 a 20 minutos por animal y es sencillo y efectivo. Para el lavado se utiliza un catéter o sonda flexible con balón hinchable (modelo Neustadt/Aisch, Lampeter o Dissi) que se introduce con un mandril o fiador, para hacerla rígida, a través de la vagina, cervix y cuerpo uterino hasta uno de los cuernos.

Cuando el extremo de la sonda se halla en la curvatura mayor del cuerno uterino se retira el mandril de 8 a 10 cm y se sigue avanzando con cuidado la sonda flexible en dirección craneal. A continuación se infla el balón que se encuentra inmediatamente detrás del extremo del catéter (de 10 a 20 ml). Se controla el grosor y la situación del balón y se retira el fiador totalmente. La situación del catéter es correcta cuando el balón, según los diferentes tamaños de los distintos úteros, se encuentra más o menos 5 cm craneal a la bifurcación uterina, a la altura,

aproximadamente, del ligamento intercornual. (Fig. 6.1 pag. 133).

La recogida de los embriones se lleva a cabo por medio de un lavado con una solución templada en fracciones de 30 a 50 ml que fluyen de nuevo al matraz de recogida previamente tratado con silicona, tras retirar la jeringuilla de la sonda. Mientras el líquido de lavado fluye es conveniente mover y masajear ligeramente el cuerno uterino. así, embriones localizados en criptas o pliegues son arrastrados por la corriente del medio hacia el exterior. Durante la introducción del líquido se debe levantar y estirar el cuerno alternativamente y realizar movimientos pendulares con él. Pero mientras el medio fluye fuera del mismo se debe mantener inmóvil hasta que haya cesado la corriente de salida. Al finalizar el lavado de uno de los cuernos uterinos se debe infundir de nuevo de 20 a 50 ml de medio levantándose el extremo craneal del cuerno para posibilitar el reflujó del último resto del líquido infundido ahí acumulado.

El lavado del otro cuerno se realiza de modo análogo. En total, por donante, se estima necesario un litro de medio de lavado para ambos cuernos. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que alcanzada una rutina de trabajo en los lavados, cantidades de 250 ml por cuerno en vacas (en novillas 180 ml) son suficientes. El medio resultante de la recogida se mantiene a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los embriones, debiéndose evitar oscilaciones de temperatura.

Además de este método de recogida embrionaria descrito existen variaciones que se diferencian de este en la utilización de aparatos diferentes o complementarios y cuya conveniencia se valora de modo diferente. Lo que determina en definitiva que método de lavado se prefiere es la apreciación subjetiva. Por regla general, el que se elige, es el sistema con el que se ha aprendido a realizar la ET o con el que se ha alcanzado una mayor rutina de trabajo.

Utilizándose el catéter de lavado es posible, por ejemplo, en vez de infundir el líquido mediante jeringuillas introducirlo aprovechando la fuerza de la gravedad. Para ello se infunde el medio, como en un sistema de goteo, a través de una sonda extra que se adapta al catéter. Esta sonda extra consta de un adaptador para el catéter de lavado y de una bifurcación en dos circuitos, de entrada y salida que desembocan en una pieza en <<Y>>. La botella de medio se cuelga un metro más o menos por encima del animal y el flujo de líquido se regula mediante el cierre y apertura del circuito. El reflujo de la solución infundida en la matriz se sucede mediante la apertura del circuito de salida. El lavado fraccionado se realiza alternando el cierre y la apertura de ambos circuitos respectivamente. El medio de lavado que refluye se recoge en un matraz o en una probeta o se conduce directamente a través de un filtro de embriones.

La utilización del filtro de embriones integrado en el sistema optimiza el proceso, en la medida en que la solución de lavado es filtrada directamente y no se tiene que conservar mientras dura el trabajo de recogida. Otra ventaja de este sistema cerrado es que ni la solución ni, por tanto, los embriones entran en contacto con

el ambiente. Sin embargo y a pesar de sus ventajas, no es la técnica de ET que se ha impuesto en todos los sitios.

Los filtros de embriones que hay (por ej., Emconmiliter, Miniflush) se diferencian en su forma de uso y se deben utilizar siguiendo las indicaciones de cada fabricante. En cualquier caso hay que procurar que quede una cantidad suficiente de medio en el filtro en el que sobrenadan los embriones para que estén siempre en solución líquida.

Las donantes superovuladas con éxito presentan tantos cuerpos luteos como folículos ovulados y por lo tanto, un nivel de progesterona alto. La progesterona, al ser la hormona de la gestación, tiene un efecto reductor de la lactogénesis, lo que provoca en algunas vacas una bajada en la leche tras la superovulación. Para evitar esto es conveniente aplicar al animal prostaglandina F_2 una vez acabado el lavado con lo que se reducirá esta elevada producción de progesterona. La luteolisis tiene además, la ventaja de que, así, la donante entra en celo algo más pronto evitándose una posible e indeseada gestación múltiple en caso de que no se hubieran arrastrado todos los embriones tras el lavado.

5.2 Aislamiento de los embriones

Los recipientes con la solución resultante del lavado de embriones se mantienen a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los mismos. En caso de imperar una temperatura demasiado fría se requiere conservar los matraces con la solución de recogida en un baño de agua a 25°C . Aunque los embriones son

relativamente resistentes a la temperatura en caso de una bajada de la misma, no se debe superar bajo ningún concepto una temperatura ambiente de menos de 20°C.

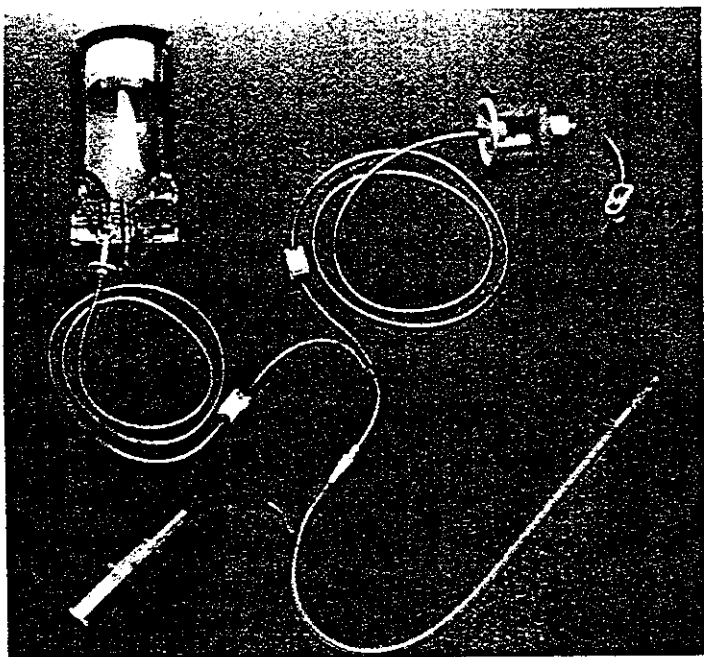


Figura 6.5 Equipo de lavado en sistema cerrado. Botella de medio, sonda extra con pieza en forma de Y, catéter de lavado <<Dissi>> y filtro Emconfilter integrado en el sistema.

Antes de proceder a la búsqueda y aislamiento de los embriones se debe reducir el volumen del líquido de lavado. Para ello se vierte toda la solución, exceptuando los últimos 50 ml, por un filtro de embriones o bien se aspira el sobrenadante después de que los embriones hayan sedimentado. Dicha sedimentación dura entre unos 15 6 20 minutos.

La aspiración del sobrenadante es algo más engorrosa que la filtración pero también tiene sus ventajas, sobre todo cuando el líquido presenta restos de moco u otras partículas que taponan el filtro. Mediante una sonda de sili cona de 2 mm de calibre se retira el sobrenadante hasta una altura de aproximadamente 5 cm, se agita suavemente el sedimento y se vierte en una placa de Petri grande o en vidrios de reloj. Para estar mas seguros el recipiente de recogida se debe enjuagar con algo de medio después de haberlo vaciado la primera vez, para evitar la posible pérdida de los embriones que hubieran podido quedar en el mismo.

Si se utiliza un filtro de embriones (con un tamaño de poro de 70 mm) se vierte la solución de lavado directamente sobre el filtro, agitando simultánea y suavemente el recipiente hasta vaciarlo. Con la agitación se pretende evitar que los embriones que hayan sedimentado permanezcan en el matraz. Mientras el filtrado, se debe procurar que los embriones retenidos por el filtro estén en todo momento rodeados de líquido puesto que, en caso contrario, se secan y se deshidratan. Es por esto que los filtros de embriones constan de una pequeña sonda de silicona con la que se puede controlar el flujo de líquido que sale mediante una pinza mosquito. Una vez vertida toda la solución de recogida sobre el filtro y alcanzada la cantidad de medio deseada junto con los embriones, se vacía el contenido del filtro sobre una placa de Petri.

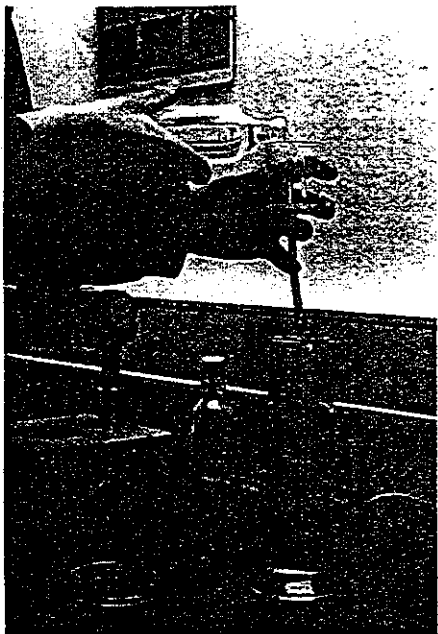


Figura 6.6 Filtrado de la solución de lavado recogida.

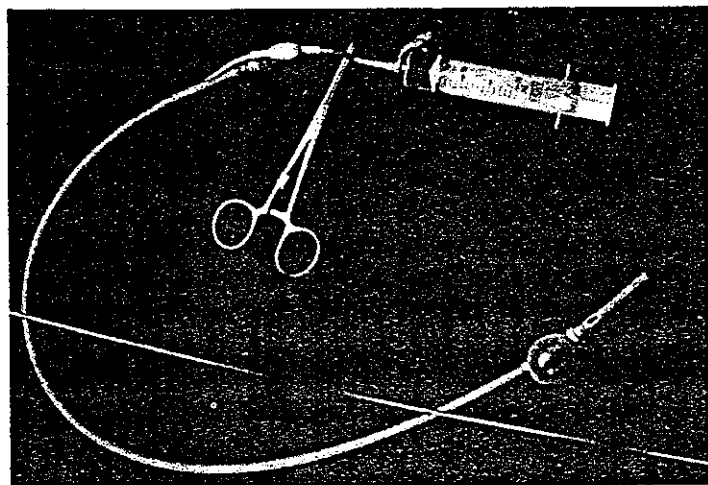


Figura 6.2 Sonda de lavado «modelo Neustadt/Aisch» con el balón inflado, la jeringuilla de aire mosquito y mandril o fiador.



Figura 6.3 Demostración del paso del cervix y del cuerpo del útero con un catéter de lavado en un útero aislado.



Figura 6.4 Recogida incruenta de embriones bajo control rectal manual.



Figura 6.7 Vaciado a una placa de Petri y lavado del contenido de un filtro de embriones.

Inmediatamente después se lava el filtro con una jeringuilla de 2 cc y una aguja fina utilizando el mismo medio de lavado a presión, para estar seguros de que no quedan embriones atrapados en la malla.}

Otra posibilidad para reducir el volumen de líquido hasta la cantidad deseada es la utilización de un filtro reclinable. Con este filtro que, al igual que el filtro de embriones, presenta un grosor de poro de 70 μm , se aspira el sobrenadante de la solución de

recogida contenida en una probeta. En este caso no es necesario sedimentar antes porque el filtro mediante el flujo de liquido, impide que los embriones se reemulsionen. Los embriones contenidos en el volumen final de liquido se vierten, como se ha descrito anteriormente, o en vidrios de reloj o en una placa de Petri grande.

Para la búsqueda de los embriones se examina el volumen de solución restante bajo la lupa estereoscópica a 10 6 20 aumentos y con luz difusa. En caso de usarse placas de Petri es conveniente que tengan la base cuadriculada, lo que facilita el proceso en gran medida, al poder realizarse la búsqueda de



Figura 6.8 Búsqueda de embriones en un laboratorio ambulante montado en una explotación.

manera sistemática, cuadro tras cuadro, sin perder la orientación en el campo. Sin la

cuadrícula es muy fácil saltarse sectores que quedarán sin examinar y dejarse embriones sin descubrir.

Los vidrios de reloj no necesitan estar cuadrículados ni divididos de ninguna forma porque el volumen de líquido a examinar y la superficie de búsqueda es mucho más pequeña y fácil de abarcar. Aun así es conveniente realizar una inspección sistemática de la solución final de recogida, por ejemplo, comenzar en la periferia e ir avanzando hasta el centro en forma circular. De todos modos se debe examinar, por principio, la solución resultante del lavado como mínimo dos veces por razones de seguridad.

Los embriones que se encuentren se aspiran con una Unopette® adaptada a una jeringuilla de 1 ml bajo control visual. Luego, estos embriones se pasan a una placa de Petri pequeña con medio de cultivo donde se van agrupando todos. Una vez finalizada la búsqueda ya pueden sufrir los embriones las consiguientes manipulaciones previstas. Si se aíslan embriones de varias hembras donantes a la vez, se deben rotular las placas de Petri con nombres o números que correspondan al animal de procedencia de manera que no den lugar a error.

5.3 Valoración de los embriones

Bajo la lupa estereoscópica con haz de luz difusa, entre 10 y 60 aumentos, se examina el estado morfológico de los embriones y se clasifican según su calidad. Los embriones en perfecto estado desde el punto de vista morfológico se pasan a

una placa de Petri pequeña con medio de cultivo recién filtrado y así se lavan 10 veces (para diluir posibles germenés) conservándose a temperatura ambiente hasta su transferencia o próxima manipulación. Cada paso de lavado debe realizarse en una dilución 100 de la solución anterior y el transporte de los embriones de una placa a otra se debe realizar cada vez con micropipetas estériles (Unopetten[®]).

Tan solo se deben transferir aquellos embriones que se encuentran en un estadio de desarrollo correspondiente a su edad y de los que, basándonos en sus características morfológicas, cabe esperar continúen su crecimiento. Ovocitos así como embriones totalmente degenerados, se deben rechazar inmediatamente.



Figura 6.9 Extracción de un embrión mediante la aspiración con una Unopette en una placa de Petri.

Embriones con diferentes formas de degeneración (por ej., blastomeros pignóticos o colapsados) se recuperan a menudo cultivándose *in vitro* durante unas horas tras lo que pueden ser transferidos. Por ello, en programas comerciales de ET, se procede a la transferencia inmediata de los embriones en perfecto estado morfológico y los que se muestran parcialmente dañados se vuelven a valorar tras unas horas de cultivo. Después y según su estado se aprovecharán o desecharán definitivamente.

La identificación de los diferentes estadios de desarrollo y su valoración desde ovocito hasta embrión de 7 días es una tarea difícil puesto que tanto los ovocitos como los embriones presentan el mismo grosor, siendo fáciles de confundir. Están englobados en una membrana elástica (*Zona pellucida*) que permite el desarrollo del embrión desde la fertilización hasta el día 7 sin sucederse apenas variación en su tamaño. El diámetro de la *Zona pellucida* es, hasta este momento, de 100 a 120 μm aumentando luego un poco para acabar con la eclosión del blastocisto que comenzara ya fuera su crecimiento. En el caso de morulas es, a veces, especialmente difícil el diferenciarlas de los ovocitos no fecundados o no divididos porque el contenido celular de las morulas compactas con blastomeros de igual tamaño y el de los ovocitos ofrecen, poco más o menos, el mismo aspecto. Los blastomeros de una mórula compacta en estadio de 64 células son muy pequeños y las delimitaciones entre células no son tan claramente visibles como en estadios más tempranos (por ej., 16 o 32 células).

La diferenciación y valoración de los blastocistos es, por el contrario, mucho menos dificultosa debido a la diferenciación celular que tiene lugar y que, gracias a la formación del embrioblasto y trofoblasto, se hace fácilmente visible. En el blastocisto temprano comienza a formarse el blastocele que es mas claro y que según va avanzando el desarrollo se hace cada vez mas grande hasta alcanzarse, finalmente, el estadio de blastocisto expandido, donde se observa el macizo celular interno característico del embrioblasto.

La apariencia de los embriones parcialmente degenerados presenta muy diferentes características debiéndose sopesar en cada caso si un embrión debe ser utilizado o rechazado directamente. Para ello se debe tener también en cuenta el valor genético del embrión así como el número de receptoras disponibles. Sin embargo, debemos asumir que, por regla general, el resultado de la transferencia de estos embriones parcialmente degenerados será siempre peor que el de los embriones morfológicamente ideales, sin ninguna imperfección. Así pues se podrán transferir sin duda móculas en estadios de desarrollo algo retardados de 32 células. Aquellas en estadios mas retrasados, de 16 células, se transferirán con muchas reservas y estadios de división celular aun mas tempranos (8, 4 o 2 células) no se consideran transferibles. Los embriones con algunos blastomeros sueltos son, sin duda alguna, tanto transferibles como aptos para otras manipulaciones (crioconservación, partición). Los embriones con muchos blastomeros sueltos (de 30 hasta 60%) pueden ser, en algunos casos y con reservas, transferidos pero no valen ni para la congelación ni para la partición.

La clasificación de los embriones según su estado de desarrollo siguiendo unos criterios morfológicos es de especial importancia para el comercio internacional de los mismos. Por ello se requiere un listado de las múltiples y variadas características morfológicas de los embriones estandarizadas y aceptadas en general por todos los profesionales. Para la clasificación de los diferentes estadios de desarrollo y calidades, a utilizar, tanto en el comercio como en la manipulación técnica de los embriones, es indispensable una descripción en general aceptada y estandarizada de estos. En los consejos del ADR (Arbeits Gemeinschaft Deutscher Rinderzuchter) N° 7.1 (Bonn, 10-4-1991)

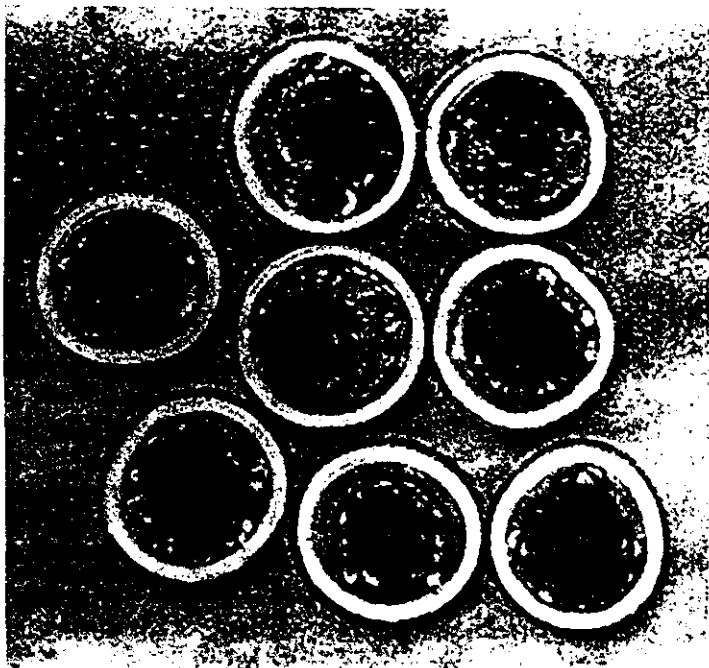


Figura 6.10 Ocho embriones transferibles y crío conservables obtenidos de un lavado (clase 1 y 2).

viene una descripción y una clasificación de la morfología de los embriones fácil de comprender y aceptada en general.

Los embriones/ovocitos recolectados por lavado el día 7° (día 0 se considera el día de la inseminación) se clasificarán según su edad y estadio de desarrollo de la siguiente manera:

M = mórula temprana

MM = mórula compacta

BB = blastocisto inicial

UE = ovocito no fecundado

DE = embrión total o mayoritariamente degenerado

La descripción cualitativa y consiguiente clasificación de los embriones es la siguiente:

Clase 1 calidad excelente

Embrión esférico, *Zona pellucida* intacta, cúmulo celular perfectamente estructurado con células del mismo tamaño color y textura. Clase 2 calidad buena

Embrión esférico o ligeramente elipsoidal, *Zona pellucida* intacta, algún blastómero suelto pero, por lo demás, cúmulo celular perfecto. Clase 3 calidad regular

Zona pellucida intacta o dañada, blastómeros de diferentes tamaños, cúmulo celular con un 30 hasta un 60% de blastómeros intactos, ligero

retraso del desarrollo (estadio de 32 células).

Clase 4 calidad mala

Zona pellucida intacta o dañada, blastómeros degenerados y sueltos en número considerable, cúmulo celular suelto y con menos del 30% de blastómeros intactos, desarrollo retardado con estadios embrionarios de blastómeros grandes (32, 16 células).

Clase 5 embrión degenerado

Zona pellucida normalmente intacta, cúmulo celular con aspecto desorganizado y suelto, blastómeros de diferentes tamaños y pignóticos en muchos casos, estadios de desarrollo ya paralizado (2, 4, 8 hasta 16 células).

Clase 6 ovocito no dividido

Ovocito fertilizado o no, pero no dividido, rodeado de una *Zona pellucida* intacta o no, perfectamente esférica.

La denominación de «embrión» para los estadios previamente descritos es inexacta, pero es un nombre que se ha adoptado del anglosajón utilizándose ya a nivel mundial sin reservas. El ovocito fertilizado se sigue denominando cigoto mientras que el resto de estadios siguientes se designan embrión en estado de 2 células, etc. Embriones en estadio de mórula son aquellos que se encuentran en el estadio tras la tercera división celular y que se caracterizan por presentar un cúmulo de blastómeros indiferenciados e iguales (células germinales) hasta que, finalmente, se sucede la diferenciación celular en embrioblastómeros y trofoblastómeros. A partir de aquí se denominan estos embriones con blastocele con el nombre de

blastocistos.

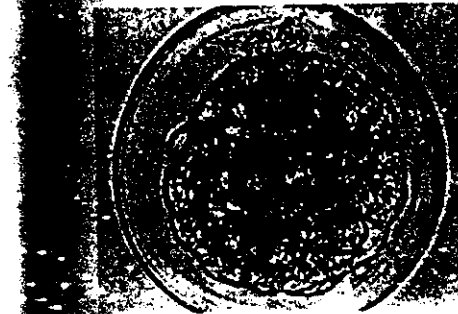
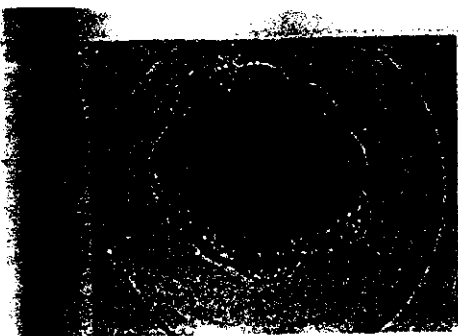


Figura 6.11 Ovocitos muertos no divididos (clase 6): a) con plasma compacto y espacio perivitelino agrandado; b) con plasma vacuolizado.

Figura 6.12 Embriones en estadio de mórulas (clase 1): a) mórula temprana (32 células); b) mórula tardía (64 células) con cuerpo polar en el espacio perivitelino.

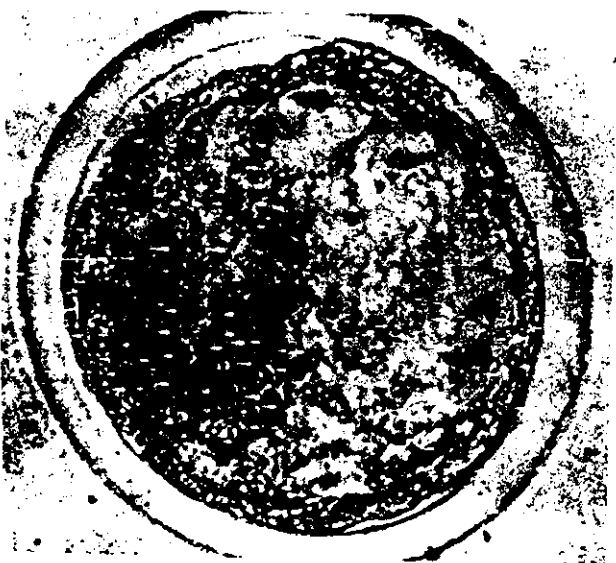
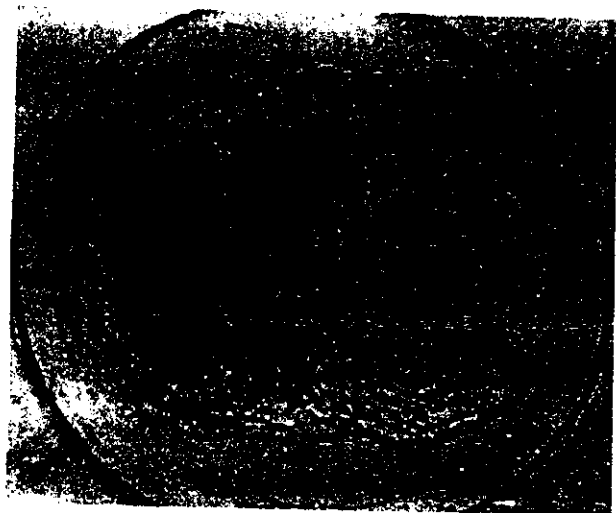


Figura 6.13 Embriones en estadio de blastocisto con el blastocelo situado a la derecha y el macizo celular interno a la izquierda: a) blastocisto temprano; b) blastocisto expandido.

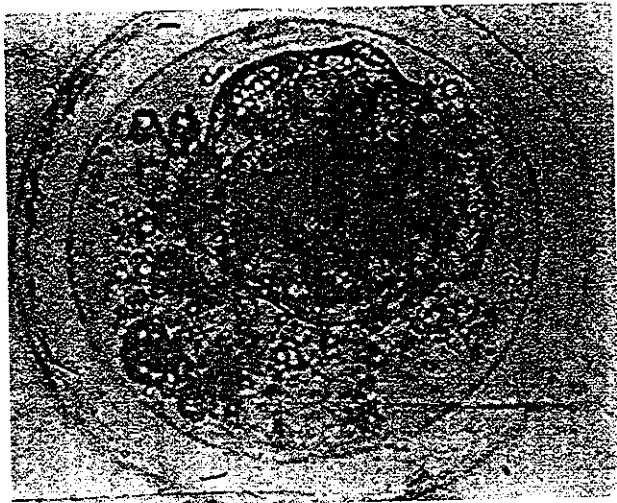
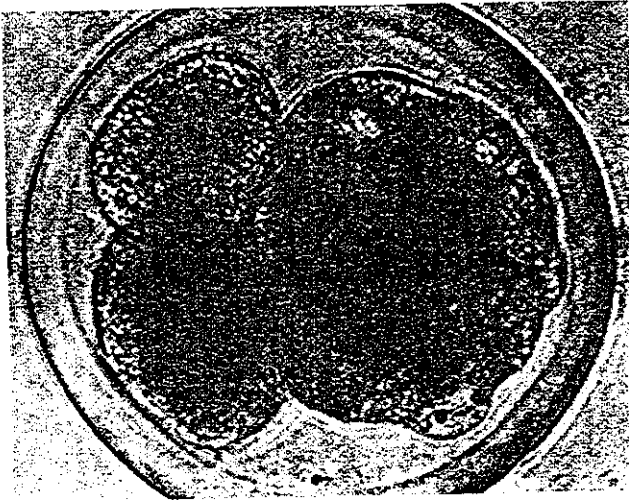
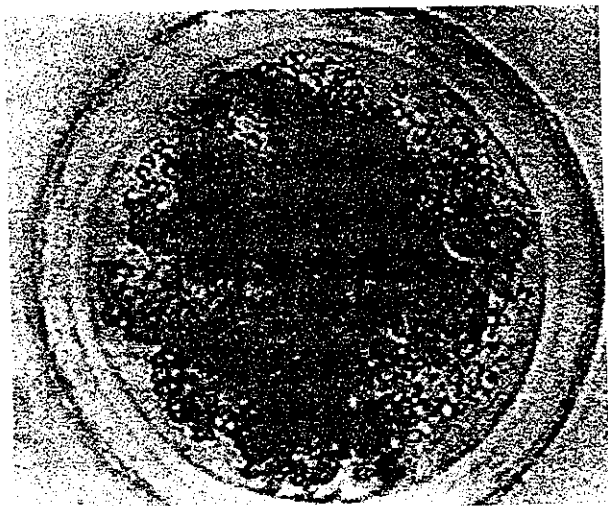
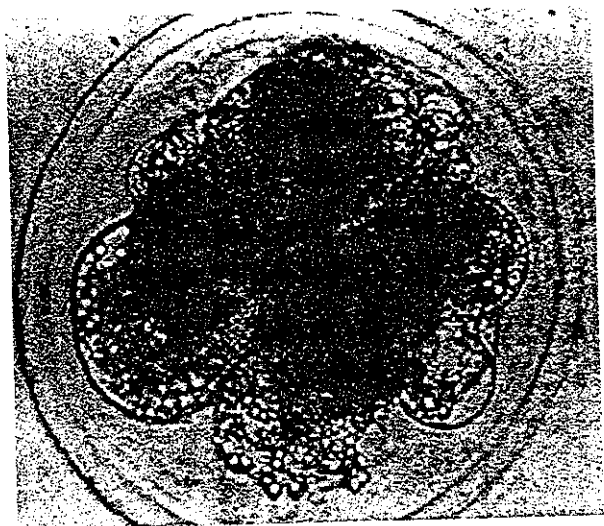


Figura 6.14 Embriones parcialmente degenerados en estadio de mórula con blastómeros sueltos (clase 3): a) con dos blastómeros grandes que se desprendieron en un estado muy temprano; b) con blastómeros degenerando que se desprendieron en un estado de desarrollo mas tardío.

54



a



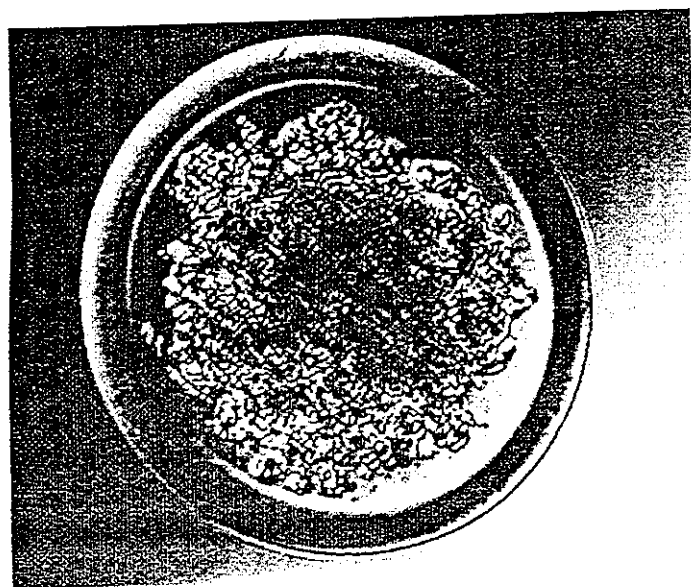
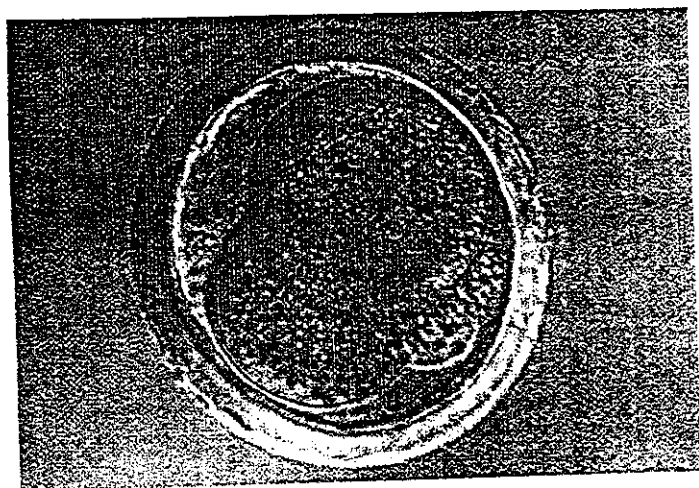




Figura 6.17 En la parte superior, corte ampliado de un ovo^cito no dividido con límite del plasma liso y el corpúsculo polar y en la inferior, corte ampliado de un embrión en estadio de mórula con las típicas irregularidades en el límite del cúmulo celular debido a las membranas celulares (arriba, clase 6, desechable; abajo, clase 1, excelente calidad).

6. Transferencia de Embriones

La transferencia de los embriones se puede llevar a cabo de forma quirúrgica o cruenta, con el animal en estación y anestesia local mediante laparotomía lateral exponiendo el útero o bien de forma no quirúrgica, por la vía natural, mediante un catéter de transferencia a través de la vagina, cervix y cuerpo de la matriz hasta depositarlo en el cuerno uterino correspondiente. Este método se denomina «técnica transcervical».

El método cruento fue el utilizado inicialmente y con el que se obtenían los mejores resultados. Pero con el tiempo se han mejorado tanto el instrumental y las técnicas del implante no quirúrgico que los resultados de ambos métodos se han hecho equiparables, de manera que, en la rutina de los grupos de ET, la transferencia cruenta ha sido prácticamente superada.

Los resultados de la transferencia, ya sea quirúrgica (cruenta) o transcervical (incruenta) están en estrecha relación con las condiciones del medio en el que se prepara y realiza el programa de ET. En condiciones rutinarias las tasas de preñez esperables por medio de ambos métodos son, de media, un 60% o más. Sin embargo una varianza de 0 a 100% es posible y se sucede por influencia del azar. En el caso de un fracaso absoluto en la transferencia se sospecha de circunstancias no identificadas (como intoxicaciones alimentarias por aflatoxinas u otros tóxicos) que anulan el éxito de los implantes porque las receptoras son estériles o, al menos, subfértiles en el momento de la transferencia. Además, descuidos en la preparación del programa se suman igualmente mermando la fertilidad de las receptoras.

Los embriones a transferir de las clases I hasta la 4 se manipulan como ya se ha descrito en el apartado 6.3 y se colocan individualmente en una pequeña cantidad de medio de cultivo. Para la transferencia quirúrgica se utiliza un capilar de transferencia y para la no quirúrgica una pajuela esterilizada. El embrión se debe localizar en un segmento de medio de cultivo separado de los otros por medio de burbujas de aire para evitar que se pierda al inclinar la pajuela. Para ello se aspira, en

primer lugar, medio de cultivo, a continuación, algo de aire. Tras esta burbuja de aire se aspira bajo control visual al microscopio el embrión con un volumen de medio de cultivo. De nuevo se toma un poco de aire y el resto de la pajuela se rellena de medio. De esta manera el embrión queda situado en el segmento central de la pajuela entre las dos burbujas de aire. A continuación se deben identificar las pajuelas de manera segura (por ej., con un código) para no dar lugar a confusión sobre la identidad del animal donante.

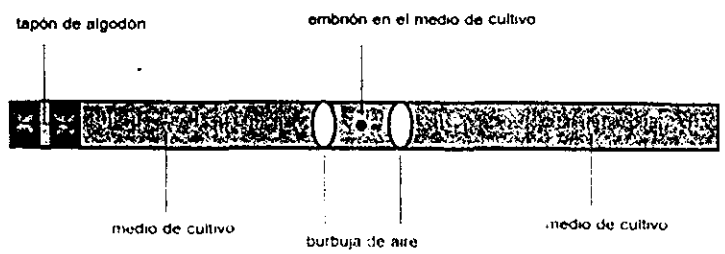


Figura 7.1 Esquema del Llenado de la pajuela para la transferencia no quirúrgica. El embrión se localiza en el segmento central de la pajuela delimitado a ambos lados por las burbujas de aire.

10 minutos antes de llevarse a cabo la transferencia se aplica a las receptoras un relajante uterino (200 mg de lactato de isoxuprina) i.m. tras lo que se implanta el embrión en el cuerno uterino correspondiente al cuerpo luteo palpado (transferencia ipsilateral). La aplicación de un relajante uterino tiene como consecuencia la relajación e inmovilización del útero lo que facilita la transferencia. Además se asume que durante la transferencia embrionaria sin relajante uterino se pueden provocar ondas de contracción uterina que expulsarían el embrión. Sin embargo, los resultados de preñez sin aplicación de la isoxuprina ponen en duda si su

administración es realmente necesaria.



Figura 7.2 Pajuela en posición diagonal durante la aspiración del medio de cultivo para finalizar el llenado de la pajuela. El embrión se encuentra ya entre las dos burbujas de aire claramente visibles.

7.1 Transferencia quirúrgica

La transferencia quirúrgica se realizara desde el flanco izquierdo o derecho dependiendo de la localización del cuerpo luteo. Si este se sitúa en el ovario derecho se prepara el campo en el flanco derecho y si no en el izquierdo.

El abordaje quirúrgico necesario para la transferencia se realizara según las normas generales de la cirugía. El tamaño de la incisión será suficiente con que permita la introducción de una mano en la cavidad abdominal para poder exponer la punta del cuerno uterino. El cuerno es punzado con una aguja roma y el embrión, que se encuentra en el capilar con medio de cultivo, es depositado en el lumen del útero cuidadosamente. Una vez repuesta la matriz a su localización natural se sutura la herida operatoria.

6.2 Transferencia no quirúrgica

La transferencia no quirúrgica transcervical de los embriones es actualmente el método de elección y se lleva a cabo, al igual que la inseminación artificial, bajo palpación rectal por las vías naturales a través de la vagina, cervix (de ahí otrascervical»), cuerpo de la matriz hasta el cuerno uterino ipsilateral.

Para ello se coloca el embrión ya localizado en la pajuela (0,25 ml) en el catéter de transferencia (aguja de implantación o pistola de transferencia) cuya apertura se encuentra situada lateralmente en el extremo final del mismo. En el otro extremo del catéter hay una marca que se corresponde con la orientación de esta apertura para que el profesional sepa siempre donde se encuentra esta y en el momento de la implantación del embrión la situara hacia ventral. En esta posición el embrión puede salir en el medio englobado en las gotas del mismo, cayendo por su propio peso, lo que desde otra postura, dorsal o lateral, es mas difícil.

El catéter de transferencia se prepara, en general, de manera semejante a uno de inseminación y la forma de proceder exacta se diferencia solamente según el tipo concreto de catéter. En el caso de catéteres de punta larga se desenrosca la misma, se encaja la pajuela ya preparada en la punta, con el extremo abierto hacia delante y se monta el catéter con el mandril retirado enroscándola de nuevo. Los catéteres de punta corta se montan el revés. Se introduce la pajuela con el tapón de algodón hacia delante en el cuerpo del

catéter desenroscado y la punta del catéter se aplica sobre el extremo abierto de la pajuela que mira unos milímetros fuera del catéter y se enrosca. Los últimos catéteres de implantación presentan el mismo calibre en toda su longitud y se pueden montar desde el extremo posterior sin necesidad de desenroscar la punta. A continuación, mediante el fiador, se desplaza la pajuela a través del cuerpo del catéter hacia delante hasta situarla en la punta del mismo. El catéter de transferencia es igual que un catéter de inseminación diferenciándose únicamente en la longitud, siendo algo mas largo, y en que la funda de plástico presenta una cabeza de metal con dos aperturas laterales.

Una vez montados los diferentes catéteres se avanza cuidadosamente el fiador hasta que aparezca una gota de medic en la apertura del catéter. De este modo se evita que, durante la transferencia, se llene la punta del mismo de moco donde quedaría el embrión retenido al inyectarlo siendo arrastrado fuera del animal al retirar el catéter.

El catéter, ya antes de montarse, se debe proteger con una camisa sanitaria abierta en su extremo posterior con la que se introducirá a través de la vagina hasta el cervix. A continuación se tira caudalmente de ella hasta perforarse y retirarse del catéter para pasar este a través del cervix al cuerpo y cuerno uterino ya sin la funda. Es conveniente, una vez en el cuerno, avanzar el catéter muy cuidadosamente por lo menos hasta la curvatura mayor o, incluso, si es posible, pasar esta hasta el tercio craneal del cuerno y depositar allí el embrión.

El paso del cervix con el catéter de transferencia es para un profesional experimentado relativamente fácil, siendo algo mas complicado al principio el introducirlo en uno u otro cuerno. En caso de una manipulación inadecuada y algo violenta se puede dañar o incluso perforar el cuerno uterino fácilmente a la altura de la curvatura mayor. Movimientos bruscos del animal también pueden traer como consecuencia la perforación de la matriz que no será de mayor importancia siempre que sea de carácter puntual, no se produzcan hemorragias y no se introduzcan contaminaciones en la cavidad peritoneal. Cuando esto ocurre, si se dispone de otra receptora para el embrión, se debe interrumpir inmediatamente la transferencia por razones de seguridad. En su defecto se puede depositar el embrión en el otro cuerno uterino del mismo animal (transferencia contralateral) pero las tasas de preñez se ven mermadas por lo menos en un 30%.



Figura 7.4 Montaje del catéter para una transferencia incruenta con una pajuela ya preparada.

A veces resulta complicado avanzar suficientemente el catéter en el cuerno uterino para depositar el embrión. Para lograr superar la posición craneoventralmente caída del cuerno tras la curvatura mayor puede servir de ayuda tomar dicho cuerno entre el pulgar y dedos índice y corazón, levantarlo estirándolo un poco y en ese momento avanzar cuidadosamente el catéter, volver a realizar el mismo proceso de nuevo y así, poco a poco, ir avanzando en el cuerno hasta alcanzar la posición deseada. En el momento en que el catéter se encuentre en la posición requerida se presiona el mandril depositando el embrión en el lumen uterino. Si no se ha conseguido introducir el catéter suficientemente craneal en el cuerno o únicamente es posible hacerlo con un riesgo elevado de dañar la matriz, solo nos queda la posibilidad de deponer el embrión en una posición más caudal en el cuerno. Otra alternativa es disponer siempre de una o dos receptoras en reserva lo que evita situaciones algo embarazosas, sobre todo para los que acaban de empezar, en caso de no lograr pasar el cervix.

Tras un intento fallido de transferencia se debe cambiar el catéter por uno nuevo puesto que en un paso difícil del cervix se suele acumular sangre o moco en la punta del mismo o incluso, tras muchos intentos obstinados, hasta en el extremo de la pajuela. Además hay que tener en cuenta, por supuesto, el riesgo de transmisión de gérmenes al introducir el mismo catéter de un animal al otro.



Figura 7.5 Transferencia incruenta de embriones. La rotulación del animal (tres líneas en la grupa izquierda) significa que el embrión se debe implantar en el cuerno izquierdo y que el animal es de muy buena calidad como receptor.

7. Almacenamiento y Conservación de los Embriones

Los embriones obtenidos tras el lavado se pueden manipular de diversas formas. Así pues, el mantenimiento de los embriones en medio de cultivo a temperatura ambiente es el modo más efectivo y fácil de superar un intervalo corto de tiempo (de varias horas) y de gran interés es la crioconservación en caso de tratarse de periodos de tiempo más grandes o de tener que salvarse distancias considerables (comercio de importación/exportación, escasez de receptoras; reserva genética; exámenes analíticos previos a la transferencia/tipificación del genoma). Tras muchos intentos e investigaciones en los últimos decenios se ha conseguido instaurar de una manera satisfactoria la congelación de los embriones consiguiéndose tasas de preñez del 50% o más.

7.1 Conservación provisional/cultivo a corto plazo

La conservación provisional o cultivo a corto plazo de los embriones a temperatura ambiente permite un desarrollo mucho más flexible de los programas de ET. Así pues se puede, por ejemplo, realizar primero los lavados de todas las donantes y a continuación todas las transferencias. En caso de situarse las receptoras a determinada distancia del establo de las donantes se pueden mantener durante unas horas los embriones y transportarse luego en medio de cultivo hasta ser transferidos. El cultivo de los embriones durante 6 u 8 horas no merma en absoluto el resultado de las transferencias. Sin embargo, una vez superado este tiempo, hay que contar con una disminución de las tasas de preñez. Según va aumentando el intervalo de tiempo van empeorando los resultados de la implantación, siendo mejores 10 horas de cultivo que 12 y 12 mejores que 14, etc., hasta que tras un intervalo de 24 horas de cultivo solo cabe esperar unas tasas de preñez a la transferencia muy malas, como se ha visto ya en la practica de la ET. Por lo tanto los embriones obtenidos se deben transferrir lo antes posible a las receptoras puesto que el útero ofrece las mejores condiciones para su supervivencia.

El mantenimiento temporal de los embriones en refrigeración de 4°C hasta 8°C provoca una ralentización en el metabolismo celular que puede ser conveniente en el caso de tener que cultivarlos durante mas de 8 horas, pero este método no se ha llegado a imponer en la practica (tasas de preñez reducidas).

7.2 Crioconservación

El objetivo de la crioconservación es la interrupción del metabolismo celular por un tiempo determinado arbitrariamente, durante el que los embriones se mantienen en una anabiosis artificial. La actividad metabólica de los embriones conservados y almacenados en nitrógeno líquido (punto de ebullición -196°C) es prácticamente cero puesto que a esas temperaturas no es posible ningún movimiento molecular.

El momento más crítico y sensible de la crioconservación de embriones es el congelado y descongelado puesto que es, en ese instante, cuando se suceden una infinidad de procesos físico-químicos regidos por las diferencias de temperatura y transporte de agua entre las células y el medio. Los daños de congelación en el embrión se producen o bien por el gradiente de osmolaridad que provoca tensiones mecánicas sobre las membranas de las organelas celulares de los embriones o por efectos bioquímicos debido a la toxicidad de las soluciones crioprotectoras. Sin embargo el mantenimiento de las características originales del embrión (metabolismo y capacidad de crecimiento) tras su congelado es únicamente posible con la utilización de crioprotectores y de diferentes protocolos de congelación.

7.2.1 Congelado

Antes de la congelación los embriones se lavan 10 veces en medio de cultivo mientras se sucede su valoración y clasificación y se mantienen en una vertido ya en rutinaria para los equipos de ET. Para ello se preparan primero los embriones a congelar en glicerina y se refrigeran (hasta -6°C), tiempo (10, 15 minutos) en el que

se incuban, preparan y mantienen los otros embriones para congelar con el metodo directo.

Es muy *fácil* organizar tecnicamente este intervalo de tiempo y conseguir congelar simultaneamente con ambos metodos. Una vez que todas las pajuelas con los embriones se encuentran en la congeladora se induce la cristalización (*seeding*) a -6°C y se mantienen a esta misma temperatura durante 5 minutos. La cristalización se induce manualmente con una pinza sumergida previamente en nitrógeno líquido o automáticamente mediante un programa moderno de congelación con sustancias criostáticas. A partir de ahí se baja la temperatura a una velocidad de $0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta el final del programa de congelación.

La temperatura final de congelación es de -35°C y se alcanza mas o menos una hora después iras lo que se introducen las pajuelas en nitrógeno líquido donde podrán ser almacenadas. Este paso se puede hacer directamente o bien dejar los embriones 30 minutos en la maquina de congelar a la temperatura de -35°C para después sumergirlos en el nitrógeno líquido. El transvase de las pajuelas de la congeladora al nitrógeno debe ser rápido para evitar calentamientos y oscilaciones de temperatura innecesarios.

El intervalo de tiempo desde la recogida de los embriones hasta su congelación es para ellos muy crítico y debe procurarse no prolongarlo nunca mas allí de 4 horas ya que la congelación supone para los embriones un proceso bastante traumático. El cultivar los embriones antes de la crioconservación durante un

espacio de tiempo muy largo (> 4 horas) perjudica la vitalidad de los mismos y disminuye el éxito en su transferencia.

La crioconservación de los embriones se puede llevar a cabo según muy diferentes métodos que sin embargo solo se describen aquí en caso de ser de importancia para la ET llevada a la práctica y de ser utilizados en general. Los diferentes medios y su síntesis (crioprotectores, medio de descongelado y de cultivo) se describen en el Capítulo 13.

7.2.2 Almacenamiento

Los embriones criopreservados se almacenan en tanques de nitrógeno líquido a -196°C bajo cero. No se producen daños o variaciones durante su almacenamiento en intervalos de tiempo abarcables (por ej., 20 años) puesto que los únicos daños posibles a través de radiaciones extrañas que podrían tener efecto, se producirían en espacios de tiempo muchísimo más prolongados (milenios). Sin embargo la preservación y almacenamiento indefinido de los embriones sin peligro de sufrir daño alguno está solamente garantizada mientras haya nitrógeno en el tanque. En el momento en que el nitrógeno se haya evaporado se calienta el sistema (el tanque, el interior del mismo y su contenido) porque el frío de vaporización que actúa como regulador de la estabilidad en la temperatura faltaría y los embriones se mueren.

Los requisitos administrativos para el correcto almacenamiento sostienen que se deben mantener en contenedores adecuados donde no se almacenen otro tipo de células (por ej., semen) y en edificios autorizados para ello por las autoridades competentes. Siempre que los embriones se depositen por separado en distintos tanques se pueden mantener en los almacenes (laboratorio de criopreservación/almacén de semen) de centros de inseminación artificial.

7.2.3 *Descongelado*

El descongelado de los embriones criopreservados se realiza de diferente manera según la técnica seguida durante el congelado y debe de llevarse a cabo siguiendo estrictamente las indicaciones precisas, principalmente cuando se trata de embriones comprados. La documentación que acompaña a los embriones comprados consta normalmente, además de los documentos obligatorios (certificado de sanidad, certificado de ovocito, certificado de origen de los padres genéticos), de un protocolo de congelado con instrucciones para el descongelado donde se detallan los pasos necesarios para la dilución del crioprotector.

Se han desarrollado protocolos estándar de descongelado, de uso ya común, para cada uno de los diferentes métodos de criopreservación. De esta manera se extraen las pajuelas con los embriones congelados del nitrógeno líquido según las indicaciones pertinentes, se mantienen 15 segundos en el aire y a continuación otros 15 segundos en agua caliente a 30°C donde descongelan. Después de esto se secan las pajuelas, se quita el bastón o tapón rotulado (*stick*) y, según la

técnica de congelado seguida, o se someten a una manipulación previa (dilución de la glicerina) o, si son embriones conservados en etilenglicol, se transfieren directamente.

7.3 Métodos de criopreservación y congelado

El congelado de embriones de bovino que se lleva desarrollando durante, al menos, 15 años ha dado como resultado diferentes métodos de criopreservación que se usan, en muchos casos, de modo paralelo. Por ello sigue dándose el caso de tener que transferir embriones congelados durante este lapso de tiempo según diferentes métodos de criopreservación (importación de restos antiguos de almacenes de Norteamérica, desalojo de almacenes, transferencia de embriones de reservas genéticas, etc.) y que deben ser descongelados siguiendo el protocolo adecuado. Cada método de congelación requiere un tratamiento diferente en el descongelado.

7.3.1 *Método estándar*

La congelación de embriones de bovino utilizando glicerina como crioprotector es el método más difundido actualmente por lo que se le conoce con el nombre de «método estándar» de criopreservación de embriones bovinos. Este método garantiza unos resultados a las transferencias bastante estables incluso en condiciones ambientales muy variadas.

La crioprotección, preparación y criopreservación de los embriones se sucede de manera muy sencilla a través de varios pasos que se repiten frecuentemente como describimos a continuación: los embriones se mantienen en el crioprotector (medio de glicerina) a temperatura ambiente durante 1015 minutos y se aspiran en las pajuelas. Las pajuelas se preparan de la misma manera que para la transferencia en fresco (Capítulo 7) sellándose con un tapón rotulado (*stick*).

El congelado de los embriones se comienza con una temperatura de +6°C como ya se describió.

El descongelado de estos embriones se lleva a cabo siguiendo el protocolo estándar (15 segundos en el aire, 15 segundos en agua caliente a 30°C), tras lo que se seca la pajuela y se quita el *stick*. El extremo abierto de la pajuela se coloca perpendicular o algo inclinadamente sobre una placa de Petri vacía y se corta el tapón de algodón. El contenido de la pajuela fluye hacia afuera encontrándose el embrión en el medio del crioprotector en la placa de Petri. Si por alguna excepción no estuviera el embrión allí se debe lavar la pajuela con medio de dilución 1 (glicerina al 6,6%).

La dilución del crioprotector se realiza pasando el embrión del medio de congelado a una solución de glicerina, sacarosa y PBS con un gradiente de concentración decreciente.

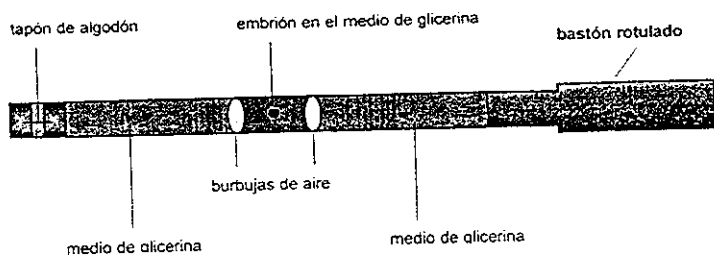


Figura 8.1 Esquema del Llenado de la pajuela de congelado semen el método estándar.

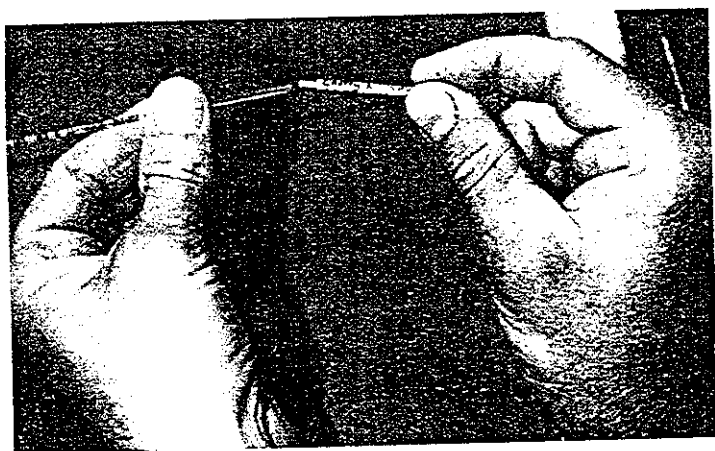


Figura 8.2 Sellado de la pajuela ya preparada para la criopreservación con un slick rotulado.

- 1° paso: de 5 a 7 minutos en una dilución de glicerina al 6,6% con solución de PBS y sacarosa 0,3 M.
- 2° paso: de 5 a 7 minutos en una dilución de glicerina al 3,3% con solución de PBS y sacarosa 0,3 M.
- 3° paso: de 5 a 7 minutos en una dilución de PBS y sacarosa 0,3 M. 4° paso: 10 minutos en medio de cultivo.

4° paso: 10 minutos en medio de cultivo.

En el medio del 4° paso se lava el embrión 10 veces tras lo que puede ser transferido.

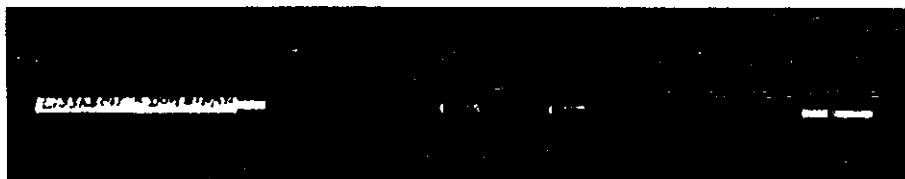


Figura 8.3 Pajuela cargada y preparada para la criopreservación con el embrión (en el segmento central), las burbujas de aire y los segmentos de medio.

7.3.2 Método One-step

La criopreservación de los embriones según el método *one-step* es el desarrollo ulterior del método estándar, utilizando el mismo crioprotector (medio de glicerina) y el mismo protocolo de congelado. Se diferencian únicamente en la preparación conjunta en la pajuela del crioprotector del embrión y del medio de dilución, así como en una manipulación más sencilla a la hora de descongelar.

La preparación de las pajuelas se realiza paso a paso. Primero se aspira medio de dilución y descongelado *one-step* hasta rellenar más o menos 1/3 de la pajuela, a continuación se aspira un poco de aire, luego el embrión en el medio de congelado con la glicerina, de nuevo una burbuja de aire y, finalmente, se llena la pajuela hasta el final con medio de dilución y descongelado *one-step* antes de sellarla con el bastón rotulado.

En el método de congelado *one-step* se considera que los volúmenes de cada medio son ideales cuando el segmento central de glicerina con el embrión y las burbujas de aire no ocupan mas de un tercio de la pajuela y los segmentos de medio descongelado a cada lado del embrión ocupan cada uno, como poco, 1/3 de la misma. El congelado se sucede de forma idéntica a la del método estándar.

El descongelado de los embriones así criopreservados se comienza como ya se ha descrito anteriormente (15 segundos en el aire y 15 segundos en agua caliente a 30°C) tras lo que, directamente después, se seca la pajuela y mediante una agitación se diluyen las burbujas de aire mezclándose el medio crioprotector junto con el medio de dilución y descongelado *one-step* en la pajuela aun cerrada.

A continuación se mantiene la pajuela en posición horizontal y a temperatura ambiente durante 10 minutos. En este tiempo el embrión recupera parte del agua cedida al crioprotector al liberarse parcialmente de el. Una vez transcurridos los 10 minutos se quita el stick rotulado y se carga el catéter de transferencia tras lo que se transfiere el embrión (Fig. 8.8, 8.9).

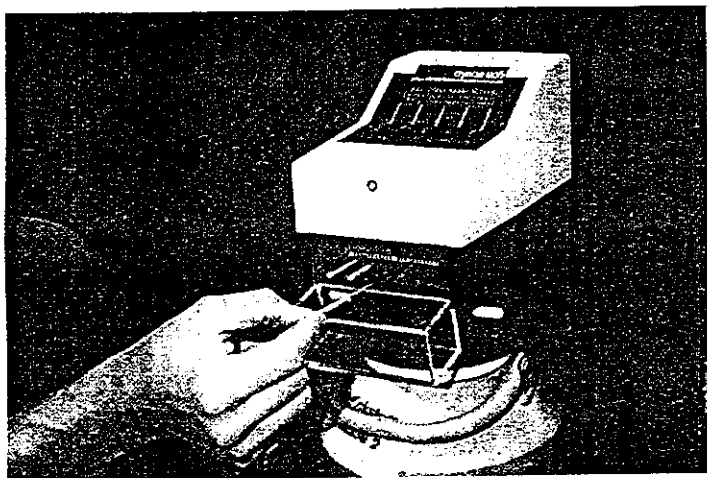


Figura 8.4 introducción de las pajuelas en la cámara de refrigeración de una maquina congeladora de embriones computerizada.

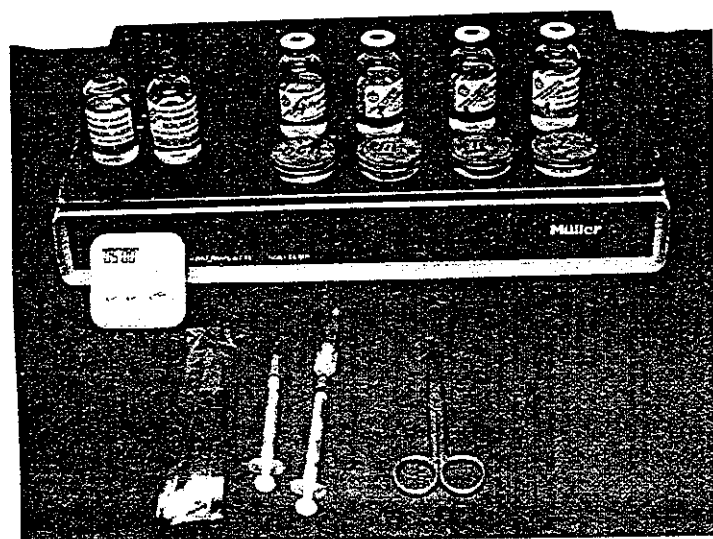


Figura 8.5 Sucesión de los medios de dilución sobre una placa caliente para la dilución progresiva de los embriones congelados (método estándar).

7.3.3 Transferencia directa

La criopreservación de los embriones utilizando etilenglicol como crioprotector y su transferencia directa tras el descongelado se conoce con el nombre de *quick thaw embryos* y se hizo famoso en 1993 en los EE.UU. Se trata de la técnica de criopreservación más sencilla para la práctica realizada hasta ahora.

Los embriones congelados según este método se transfieren directamente una vez descongelados sin necesidad de diluir ni lavar el crioprotector (etilenglicol). De este modo se consigue que el despliegue técnico y de tiempo necesario para hacer la transferencia de un embrión crioconservado en etilenglicol no sea mayor que la requerida en una inseminación artificial con semen congelado.

Para evitar la confusión durante la manipulación de los embriones criopreservados en etilenglicol respecto a los embriones congelados con otras técnicas, se preparan estos según un convenio aceptado a nivel internacional, en pajuetas amarillas transparentes y con *sticks* amarillos rotulados con las iniciales DT de «transferencia directa», además de la rotulación habitual para la identificación de los embriones



Figura 8.6 embrión colapsado (de buena calidad) inmediatamente después del descongelado y antes del transvase de la solución del paso 3° al medio de cultivo.

Las tasas de preñez que se consiguen con los embriones congelados en etilenglicol son comparables o incluso mejores a los obtenidos con los embriones criopreservados según el método estándar. Sin embargo, el intervalo en el que oscilan estos resultados es más amplio variando mucho según los diferentes programas de ET o según los equipos de ET que trabajan, lo que da pie a cuestionar en algo la utilización de este método.

El equilibramiento de los embriones criopreservados según la técnica de la transferencia directa tiene lugar en el medio de etilenglicol durante 10 o 15 minutos, igualmente que en el método anterior. La preparación de las pajuelas se puede

realizar de dos formas diferentes: o bien se rellenan solamente con medio de etilenglicol mas el embrión o bien se aspiran segmentos separados con medio de cultivo y por otro lado el embrión en el medio crioprotector con etilenglicol, pareciendo ser esta ultima opción la mas conveniente. En ambos casos se aspira el embrión en el medio de etilenglicol de manera que quede localizado en el segmento central de la pajuela y delimitado a ambos lados por una burbuja de aire.

Si la pajuela se prepara únicamente con etilenglicol se aspira, primeramente, medio crioprotector hasta 1/3 de la misma, luego algo de aire, a continuación el embrión en el etilenglicol, de nuevo una burbuja de aire y, finalmente, etilenglicol hasta rellenar totalmente la pajuela.

Si se prepara de la segunda manera se hace de modo idéntico al método *one-step solo* que utilizando otros medios. Primeramente se aspira medio de cultivo hasta un 1/3 de la pajuela, luego un poco de aire para separar el

Embrión en el crioprotector que se aspirara a continuación, de nuevo otra burbuja de aire y el resto de la pajuela se rellena de medio de cultivo.

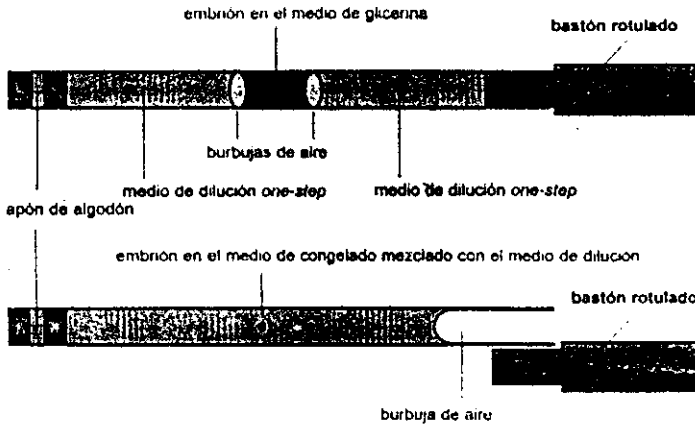


Figura 8.7 Esquema de un embrión preparado para el método *one-step*: arriba) listo para la congelación y almacenaje; abajo) listo para su transferencia una vez descongelado.

Una vez montadas las pajuelas y transcurrido el tiempo de equilibramiento se pasan estas de la temperatura ambiental, directamente, al interior de la máquina de congelar que debe ofrecer ya una temperatura de -6°C . La cristalización se induce 5 minutos después y se refrigera a una velocidad de $0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta alcanzar -35°C . Luego se introducen las pajuelas en el nitrógeno líquido. Este paso se puede realizar, también inmediatamente tras concluirse la refrigeración hasta esa temperatura o bien, dejando antes los embriones durante 30 minutos a -35°C .

Para descongelarlos se procede de manera idéntica a la ya descrita para los otros métodos (15 segundos en el aire y 15 en agua a 30°C), se seca la pajuela,

se quita el *stick* y se transfiere el embrión lo más rápidamente posible.

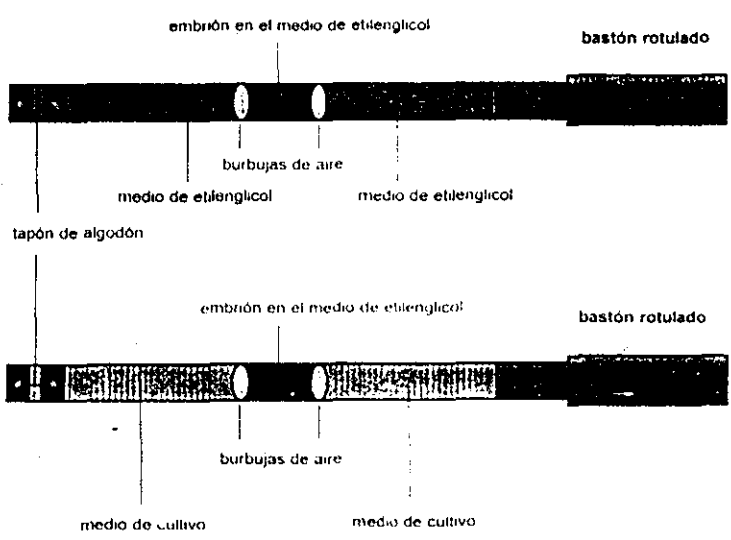


Figura 8.10 Esquema de pajuelas preparadas para la transferencia directa; arriba) pajuela rellena de medio de etilenglicol, abajo) solamente el embrión se encuentra en el medio de etilenglicol, estando los otros segmentos de la pajuela rellenos de medio de cultivo.

7.3.4 Vitrificación

La vitrificación es, de los métodos descritos de conservación de embriones bovinos, el más fácil. Sin embargo no ha alcanzado ninguna relevancia en la rutina de la ET puesto que los resultados de las transferencias son tan solo de un 30%. Pero en circunstancias especiales la vitrificación puede ser una buena alternativa puesto que nos permite criopreservar los embriones sin necesidad de maquina de congelar. Por ejemplo, en el caso de programas de ET en países en vías de desarrollo, donde no es nada fácil hacer llegar una congeladora de embriones (gastos de transporte aéreo,

danos en el transporte, requisitos aduaneros) adquiere gran importancia este método.

Los embriones a vitrificar se sumergen en el medio crioprotector durante 10-15 minutos para que equilibren y sean capaces de superar la congelación. A continuación se pasa, cada embrión por separado, bajo control visual por microscopio, al medio de vitrificación, donde se dejan durante un minuto.



Figura 8.11 Gota de medio de vitrificación englobando el embrión formada en la punta de una Unopette[®] justo antes de caer en el nitrógeno líquido.

Luego con una Unopette[®] se aspira primeramente un poco de medio de vitrificación y luego el embrión en el mismo medio hasta llenar por completo la Unopette[®]. Inmediatamente después se va vaciando la Unopette[®] muy despacio sobre nitrógeno líquido de manera que el medio englobando el embrión forma una gota en la punta de la Unopette[®] que caerá en el nitrógeno congelándose instantáneamente y que precipitará hasta el fondo en forma de pellet vitrificado.

Los embriones así criopreservados en forma de pellet vitrificado se extraen con una pinza del nitrógeno líquido y se introducen en recipientes adecuados (por ej., Gobelets) que a su vez se almacenaran de nuevo en nitrógeno líquido.

Para descongelarlos se saca con una pinza el *pellet* del Gobelet y se pasa a una placa de Petri con medio de dilución a temperatura ambiente, dejándolo así durante 5 minutos. Los embriones se examinan después al microscopio, se lavan en medio de cultivo, se aspiran en pajuelas y se transfieren.



Figura 8.12 Pellet vitrificado (congelado) en nitrógeno líquido originado a partir de una gota de medio de vitrificación englobando el embrión. Abajo Gobelet rotulado para el almacenaje de los embriones.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams GP, Matteri RL, 1992 Effect of progesterone on growth of ovarian follicles J Reprod. Fertil 95: 625 – 640
- Armstrong D.T., Evans, G. 1983 Factors affecting success of Embryo Transfer in sheep and goats
- Brindan, B.M., Phipps, L.R. 1986 Genetic and hormonal factors affecting superovulation
- Callasen, H.; Grave, T 1987 Premature ovulation in superovulation cattle., Theriogenology, 28 (2): 155 – 166
- Hoffman K. A, Walker, S.L, Youngs, CR 1988 Once daily versus twice daily treatment with follicle stimulating hormone in ewes synchronized with different doses of norgestomet. Theriogenology, 29: 261
- Picazo, R. Barragan, 1992, Efecto de la Relación FSH/LH y el vehículo de administración en la variabilidad de la superovulación y número de embriones viables. Tesis UC Madrid Pags 128 – 151
- Gorlach Albert 1997, Transferencia de embriones en el ganado vacuno, Ed. Acribia
- Rebhun William, C. 1995, Enfermedades del Ganado vacuno lechero Ed. Acribia

