



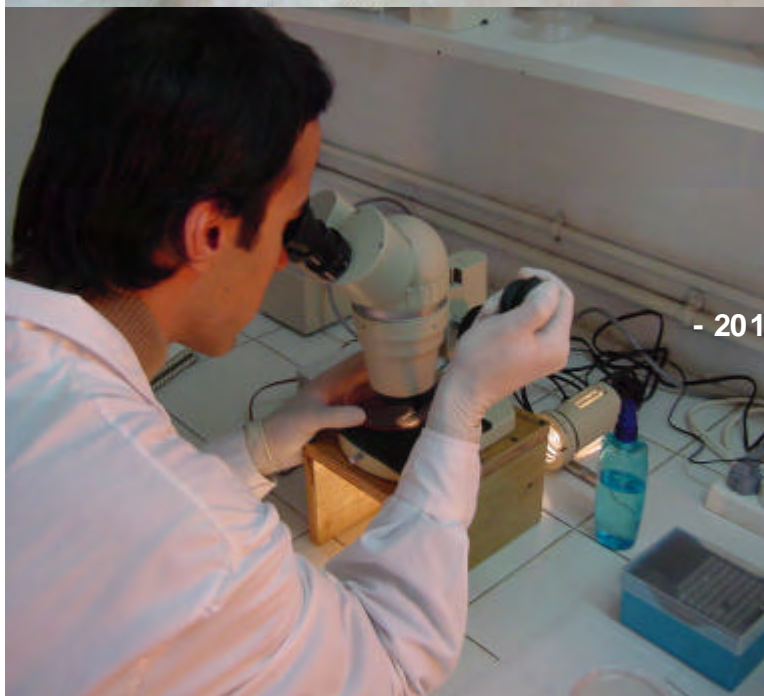
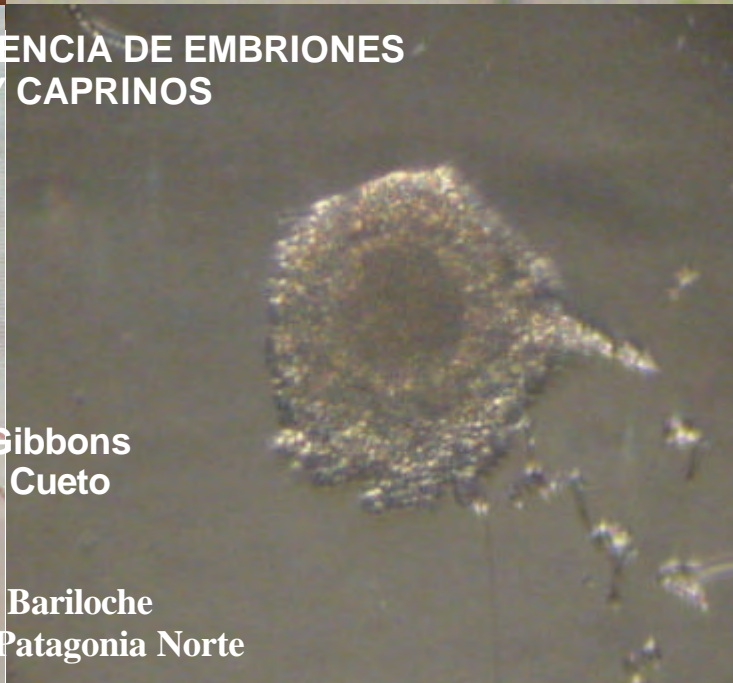
**AREA DE INVESTIGACION EN PRODUCCION ANIMAL
GRUPO DE REPRODUCCION**



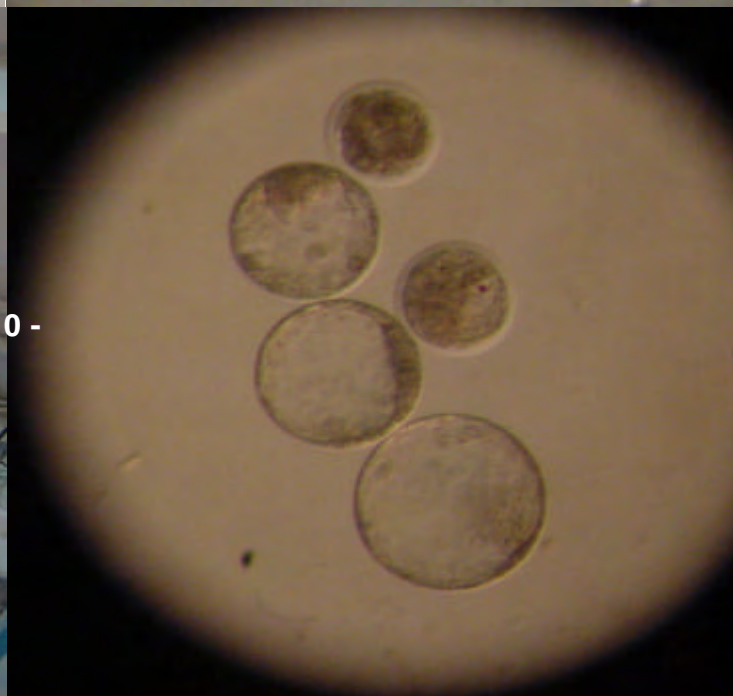
**MANUAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
EN OVINOS Y CAPRINOS**

**Dr. AE. Gibbons
Dra. MI. Cueto**

**INTA EEA Bariloche
Centro Regional Patagonia Norte**



- 2010 -



INDICE

INTRODUCCIÓN	3
Principios y consideraciones generales sobre la transferencia de embriones	4
1.- Fisiología hormonal de la reproducción.....	6
2- Estimulación ovárica para la ovulación múltiple	7
3- Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple	9
4- Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donante y receptora	11
5- Fecundación de la hembra donante.....	12
6- Colecta de embriones	14
7- Búsqueda de embriones	16
8- Clasificación de embriones.....	17
9- Siembra de embriones	19
10- Conservación de embriones.....	20
Técnica de congelamiento	21
Técnica de descongelamiento	22
Técnica de vitrificación.....	23
Eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones.....	24
Partición de embriones	25
Garantía sanitaria de la transferencia de embriones	25
Conclusiones Generales	25
Bibliografía.....	27
ANEXOS	32
Anexo 1. Grados de clasificación de embriones.....	32
Anexo 2. Medios de congelamiento	32
Anexo 3. Técnica de vitrificación	33

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es un método de reproducción asistida basado en la producción de múltiples embriones, por una hembra donante (madre genética superior) y transferidos en varias hembras receptoras (madres portadoras gestantes).

Los tratamientos hormonales para lograr una ovulación múltiple y la TE permiten utilizar intensivamente a las hembras genéticamente superiores. En los últimos 25 años se han logrado considerables avances en la TE, como herramienta del mejoramiento genético en ovinos y caprinos, siendo necesario maximizar la producción y sobrevivencia de embriones para obtener varias crías de alto mérito genético. Cabe consignar que una hembra de alto valor genético podrá formar parte de un programa de transferencia en más de una oportunidad, de manera que es posible multiplicar su potencial reproductivo, al utilizarse ovejas de escaso valor genético como receptoras de embriones genéticamente superiores (Mueller, 1993).

Las primeras transferencias de embriones en caprinos y ovinos se realizaron hace 50 años (Warwick y col, 1934). A partir de los años 60 se realizaron trabajos en Australia (Moore y Rowson, 1960) y en Nueva Zelanda (Tervit y Havick, 1976), que contribuyeron a precisar las condiciones y las posibilidades del desarrollo de esta biotecnología.

El potencial natural reproductivo de cada especie y de cada raza es una limitante a la rapidez de difusión del progreso genético. En las condiciones tradicionales de cría ovina y caprina, el número de descendientes producidos por hembra y por año es de una o dos crías, por lo tanto durante su vida reproductiva se logran obtener entre 6 a 8 crías. La TE permite incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la gran reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario. La estimulación hormonal de los ovarios desencadena la ovulación múltiple y permite multiplicar la tasa ovulatoria promedio de una raza, obteniéndose un número considerable de crías en un corto período de tiempo.

La TE posibilita acortar el intervalo generacional y en consecuencia incrementar el avance genético. A su vez, la inseminación artificial y la TE en conjunto son excelentes herramientas para el mejoramiento genético de majadas y hatos que se encuentren aislados de los proveedores de reproductores mejoradores.

La TE ha sido empleada durante los últimos 20 años en Australia y Nueva Zelanda, con el objetivo de incorporar material genético de cabras de Angora, reduciendo los riesgos sanitarios. En Francia actualmente se emplea en el programa de mejoramiento genético de razas ovinas lecheras (Lacaune: producción de queso Roquefort). La comercialización internacional de embriones congelados de ovinos y caprinos ha permitido una amplia difusión mundial de germoplasma con un muy bajo riesgo sanitario, posibilitando mejorar rápidamente el nivel genético de las diversas razas o establecer nuevos sistemas alternativos de producción en carne, leche, lana y pelo como el Mohair o Cashmere.

La finalidad de la aplicación de esta técnica en los animales domésticos tiene fundamentos de orden genético, comercial, sanitario y de conservación de especies. Permite lograr los siguientes objetivos:

- *Introducir y difundir rápidamente nuevas razas o genotipos de alto valor productivo. Las características deseables son rápidamente introducidas en la majada o hatu en una sola generación. Un ejemplo se presenta con la característica genética del “gen prolífico Booroola” que en la raza Merino ha dado a sus portadores un valor adicional que podría ser rápidamente multiplicado por la TE.*
- *Reducir riesgos en la transmisión de enfermedades, debido a que en los primeros estadios de su desarrollo, los embriones presentan una protección natural contra los agentes infecciosos. Esta ventaja comparativa ha favorecido el comercio internacional de embriones congelados.*
- *Difundir material genético de alto valor comercial con facilidad de adaptación ambiental de las crías a diferentes sistemas de producción y manejo.*
- *Aumentar el progreso genético en la producción, a través del incremento en la intensidad de selección de las madres destinadas a la producción de machos superiores, al disponer de un mayor número de crías por hembra seleccionada.*
- *Acortar el intervalo generacional. La posibilidad de obtener descendencia de las madres a temprana edad permite una reducción del intervalo generacional, con mayor beneficio cuando se emplea semen de animales jóvenes.*
- *Apoyar las técnicas reproductivas en las que interviene la micromanipulación de embriones (determinación del sexo, fecundación “in vitro”, clonación, transgénesis, etc.).*
- *Conservar razas o especies. La conservación de material genético (embriones congelados) en bancos de germoplasma permite la conservación de genes que de otra manera desaparecerían con la especie.*

Principios y consideraciones generales sobre la transferencia de embriones

La elección de las hembras donantes se realizará teniendo en cuenta su valor genético y en base a los criterios apropiados de mejoramiento de las aptitudes productivas para cada raza.

Las condiciones generales de un buen estado reproductivo, sanitario y nutricional son imprescindibles, tanto para las hembras donantes como para las receptoras. Se debe realizar el control clínico de los animales, los tests serológicos de enfermedades infecto contagiosas (Brucelosis, Aftosa, etc.) y los controles parasitarios correspondientes.

Las hembras deben al menos haber tenido una cría, y se debe considerar un mínimo de 2 meses post parto antes de comenzar los tratamientos hormonales. Acortar estos tiempos puede significar una baja en la producción de embriones.

La necesidad de utilizar hembras jóvenes como donantes puede llevar a una baja eficiencia reproductiva. En el supuesto caso de tratar una hembra nulípara, el peso mínimo deberá ser del 75% del peso adulto de la raza y haber presentado estros anteriormente.

Se recomienda no usar borregas como madres receptoras. Lo indicado son las hembras adultas, que puedan llevar a cabo la gestación sin comprometer su crecimiento y contribuir al desarrollo de la cría por medio de una buena lactancia.

La TE requiere de una serie de manipulaciones de las donantes y receptoras. En el caso de recurrir a instalaciones extrañas, es preferible que los animales tengan un período de adaptación previo, de uno a dos meses, antes de comenzar los tratamientos.

La identificación con caravanas con números visibles a la distancia, permite realizar los manejos necesarios sin cometer equivocaciones y sin provocar stress, que puede perjudicar los resultados.

Se debe considerar los aspectos sanitarios, nutricionales y reproductivos de los machos y la calidad seminal ya sea que se utilicen en servicio natural o mediante la inseminación artificial con semen fresco, refrigerado o congelado.

Previo a la realización de un programa de TE, se deberán considerar los siguientes puntos:

- 1- Fisiología hormonal de la reproducción**
- 2- Estimulación ovárica para la ovulación múltiple.**
- 3- Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple.**
- 4- Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donante y receptora.**
- 5- Fecundación en la hembra donante.**
- 6- Colecta de embriones.**
- 7- Búsqueda de embriones.**
- 8- Clasificación de embriones.**
- 9- Siembra de embriones.**
- 10- Conservación de embriones.**

1.- Fisiología hormonal de la reproducción

Los tratamientos hormonales específicos en la TE se utilizan para la inducción del estro y la ovulación múltiple (hembras donantes) o la ovulación (hembras receptoras) y la sincronización del estro entre ambas.

La *GnRH u hormona liberadora de las gonadotropinas* es un decapeptido producido por neuronas secretoras del sistema nervioso central. La secreción de esta hormona está influenciada por condiciones externas (fotoperíodo, stress, nutrición) e internas (estrógenos, progesterona, feromonas). Su acción se ejerce a nivel de las células gonadotróficas de la hipófisis, activando la síntesis y liberación de FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante).

Las gonadotropinas, FSH y LH, son glicoproteínas sintetizadas a nivel de la hipófisis anterior, y participan en la regulación de la función ovárica.

La *FSH* favorece el crecimiento y la maduración folicular y de los ovocitos; induce en los folículos maduros la presentación de receptores a la LH y sostiene la liberación de estrógenos. La secreción basal está asociada a la dinámica folicular durante la fase luteal y presenta dos incrementos durante la fase folicular: el primero conjuntamente a la descarga preovulatoria de LH, que es GnRH dependiente y otro, de menor intensidad, 18 horas más tarde producto de la caída de los niveles sanguíneos de los estrógenos (no dependiente de la GnRH).

La *LH* incrementa su concentración durante un corto período previo a la ovulación en forma de pulsos. La frecuencia de los pulsos de LH está supeditada a la estimulación de las células hipofisarias por la GnRH. Cada pulso de LH se corresponde con un pulso de GnRH. Durante la fase preovulatoria, el incremento de la secreción de estrógenos liberados por los folículos ejerce un retrocontrol positivo sobre el eje hipotálamo hipofisario, que induce al denominado "pico preovulatorio de LH".

La LH participa conjuntamente con la FSH en la maduración final del folículo, induce la liberación del ovocito (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo que presentó ovulación.

La *progesterona* es un esteroide secretado por el cuerpo lúteo; en el caso de ocurrir fertilización, se mantiene en valores constantes durante la gestación a partir de la placenta y del cuerpo lúteo. Su función es mantener la preñez hasta la parición. Antes de la ovulación, participa con los estrógenos en la manifestación externa del celo. Ejerce un retrocontrol negativo sobre el hipotálamo, inhibiendo la secreción de GnRH y la consiguiente pulsatilidad de LH, de manera que bloquea la ovulación.

La *prostaglandina* es secretada por el endometrio uterino. Su incremento induce la luteólisis (eliminación del cuerpo lúteo), y por ende, el descenso de los niveles de progesterona y la aparición de un nuevo período de estro.

2- Estimulación ovárica para la ovulación múltiple

La ovulación múltiple ha sido inducida en la especie ovina y caprina, mediante la administración de 1000 a 1200 UI de *PMSG* o *eCG*, 48 horas antes de finalizar el tratamiento progestacional. Los tratamientos con *PMSG* han dado resultados inferiores a los obtenidos mediante *FSH*, debido a que por su elevado peso molecular, tiene una vida media larga (21 horas) y provoca un crecimiento folicular disperso, induce la formación de folículos anaovulatorios, luteinización folicular prematura y reduce la fertilidad, recuperación y calidad embrionaria (Armstrong y Evans, 1983; Armstrong y col, 1983; Moor y col, 1985; Tsunoda y Sugie, 1989; Walker y col, 1989). La ovulación múltiple se presenta a las 54 horas post retiro de las esponjas intravaginales de progestágeno (*PREIP*) (Walker y col, 1986).

Una mayor eficiencia se logra cuando se utiliza *FSH* de origen porcino u ovino (Alberio y col, 1993). En contraste con la *PMSG*, el empleo de la *FSH* determina una mejor migración espermática (Evans y Armstrong, 1984), mayor tasa de fertilización cuando se emplea la inseminación artificial (Evans y col, 1984) y una mayor producción de embriones (Armstrong y col, 1983; Torres y col, 1987).

El tratamiento más aceptado para provocar la ovulación múltiple en ovinos es la aplicación de dosis decrecientes de *FSH* hacia el final del tratamiento progestacional. A diferencia de la *PMSG*, la *FSH* presenta una vida biológica corta (3 a 4 horas), por lo que se hace necesario su administración repartida en 6-8 aplicaciones cada 12 horas. La ovulación múltiple se presenta a las 60 horas *PREIP* (Foto 1) (Walker y col, 1986).

Las dosis de *FSH* se expresan en miligramos Armour, que es una unidad de actividad de un test biológico equivalente a 10 a 14 μg de hormona *FSH* pura. Las dosis recomendables para las cabras y las ovejas varían entre los 16 a 20 mg Armour (Tervit y col, 1984; González y col, 1991; Brebion y col, 1992); la respuesta ovulatoria a estas dosis está sujeta a los diferentes genotipos. El aumento de la dosis de *FSH* (mayor a 16-20 mg Armour) no produce un incremento de la respuesta ovulatoria. Asimismo la *FSH* puede expresarse en mg de NIH-*FSH*-P1, recomendándose dosis totales de hasta 200 mg por hembra donante.

Para obtener una mejor respuesta ovulatoria se aconseja administrar *LH* en forma creciente hacia el final del tratamiento progestacional (Cognie y col, 1986; Baril y col, 1989). Se recomienda una relación *FSH/LH* de 3:1 (1er a 3er aplicación), 1:1 (4ta aplicación) y 1:2 (5ta aplicación).

La presentación del celo post tratamiento de *FSH* es variable; sin embargo es habitual observar celo entre las 24 a 36 horas *PREIP*.

El "tratamiento tradicional" en ovinos combina dosis decrecientes de *FSH* con una aplicación única de *PMSG* hacia el final del tratamiento progestacional. Consiste en la colocación de esponjas intravaginales con progestágenos (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, MAP, Syntex, Argentina) durante 14 días y la administración de 200 mg de NIH-*FSH*-P1 (Folltropin-V,

Bioniche, Cánada) por oveja tratada, suministrados en 6 aplicaciones en forma decreciente de la siguiente manera: 50, 50, 30, 30, 20 y 20 mg de pFSH a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja intravaginal y administración de 200 UI de PMSG (Novormon 5000, Syntex, Argentina).

El tratamiento para las cabras es similar al presentado para el ovino. Para obtener una mejor tasa de fertilización, se recomienda un tratamiento corto con progestágeno en esponja intravaginal de 11 días y una dosis de PF2 alfa (50 µg de Cloprostenol) 48 horas antes de retirar las esponjas (Corteel y col, 1988).

Sin embargo, en la raza Merino y durante la estación reproductiva, hemos comprobado que es posible reducir la dosis total por oveja a 80 mg de NIH-FSH-P1 por donante, distribuidos en 6 aplicaciones de 18, 18, 14, 14, 8 y 8 mg, a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja intravaginal y administración de 200 UI de PMSG (Novormon 5000, Syntex, Argentina) (Figura 1, ver Punto 4). De esta manera, si bien mediante el tratamiento de baja dosis se observó una menor tasa de ovulación ($P < 0.05$), el número de embriones y la calidad embrionaria fue semejante, debido probablemente a la obtención de una mayor tasa de recuperación embrionaria y una mayor tasa de fertilización ($P > 0.05$) (Tabla 1). También es posible obtener mediante este tratamiento, más del 80% de las ovejas donantes en celo a las 36 horas PREIP. La reducción del alto costo de la FSH a casi un tercio brinda una ventaja económica para su utilización en bs programas comerciales de TE.

Cabe consignar que siempre será necesario determinar una dosis recomendable según la eficiencia del tratamiento de ovulación múltiple y ajustarla en base a la especie, raza, época del año, sistema de producción, etc.

Tabla 1. Eficiencia de la recuperación embrionaria mediante 80 mg (Baja dosis) o 200 mg (Dosis alta) de pFSH (NIH Folltropin-V) + 200 UI de PMSG (Novormon 5000) en ovejas Merino durante la estación reproductiva.

	Baja dosis	Dosis alta
Animales (n)	43	11
Tasa de ovulación (\bar{x})	13.0±0.9 a	17.5±1.8 b
Estructuras ováricas recuperadas* (\bar{x})	7.4±0.7 a	10.0±1.4 a
Tasa de estructuras ováricas recuperadas (%)	59.6±3.6 a	56.3±7.1 a
Embriones recuperados (\bar{x})	5.9±0.6 a	6.4±1.2 a
Tasa de embriones recuperados (%)	50.0±4.0 a	38.6±7.9 a
Embriones recuperados Grados 1 y 2** (\bar{x})	5.0±0.6 a	5.5±1.2 a
Tasa de embriones recuperados Grado 1 y 2 (%)	85.0±3.8 a	82.6±7.2 a
Ovocitos no fertilizados (\bar{x})	1.0±0.5 a	2.6±1.0 a
Tasa de no fertilización (%)	9.7±4.3 a	25.1±8.4 a
Tasa de respuesta (±3 CL) (%)	98.0 a	100.0 a

a, b indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$)

* Embriones + ovocitos + zonas pelúcidas

** Ver Anexo 1. Grados de Clasificación de embriones

La respuesta ovulatoria a los *tratamientos reiterados* de ovulación múltiple, está supeditada al origen de la FSH. Baril y col. (1992) demostraron una menor respuesta al utilizar FSH porcina respecto a la FSH caprina u ovina. Se sostiene que se presentan anticuerpos anti gonadotropina heteroespecífica. Se puede administrar antisuero, pero su costo es elevado.

En la cabra, tratamientos repetidos de FSH porcina produjeron la formación de anticuerpos anti-FSH (Remy y col, 1991), observándose un descenso de la respuesta ovulatoria (40 a 50% en el 3er tratamiento, hasta un 70 al 80% en el 4to o 5to tratamiento).

3- Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple

El *factor intrínseco* de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple. Estudios realizados en vacunos demostraron que solamente el 68% de las hembras respondió con embriones transferibles. El 32% restante incluía a las hembras sin respuesta a la estimulación ovárica, sin recuperación de embriones u ovocitos, o con recuperación de embriones no transferibles (Donaldson, 1984). Por consiguiente siempre se debe tener presente que un porcentaje de hembras puede no responder al tratamiento hormonal de ovulación múltiple. La variabilidad individual a la respuesta hormonal de ovulación múltiple está condicionada por factores extrínsecos (raza, estación sexual, alimentación) e intrínsecos (foliculogénesis).

La *raza* es un importante factor de variación, presentándose en las más prolíficas una mayor respuesta a la ovulación múltiple, embriones transferibles y crías nacidas (Tervit, 1986; Ritar y col, 1988; Baril y col, 1989).

La *estación sexual* también influye sobre el número medio de ovulaciones por hembra ovina, siendo superior en la estación reproductiva respecto al período de anestro (Torres y col, 1984). Esta diferencia no se observó en las cabras lecheras (Baril y Vallet, 1990b), aunque la calidad de los embriones fue superior en la época reproductiva (Baril y Vallet, 1990a). En la raza Merino hemos obtenido similares tasas de ovulación tanto en la estación reproductiva como durante el anestro estacional, observándose sin embargo una mayor tasa de fertilización durante la época reproductiva.

La *alimentación* juega un rol fundamental en la respuesta a los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, debido a que se ha demostrado que no solamente afecta la respuesta ovulatoria sino que es posible que se presenten luteólisis prematuras, tanto en estación como en contraestación sexual (Baril y col, 1989; Jabbour y col, 1991). Consecuentemente la recuperación embrionaria es baja (Armstrong y col, 1982; Tervit, 1986). En cabras, la aparición de este fenómeno es muy variable (0 a 27%). Este problema también ha sido reportado en ovinos (Trounson y Moore, 1974; Jabbour y col, 1991).

La respuesta ovulatoria a los tratamientos hormonales ha sido estudiada en base a la *presencia folicular* en los ovarios y se ha determinado que está positivamente correlacionada con el número de folículos chicos (2 a 3 mm de diámetro) al momento de la primera aplicación de FSH, la cantidad de folículos medianos (4-5 mm) al momento de finalizado el tratamiento progestacional y el número de folículos grandes (>6 mm) al momento del estro (González-Bulnes y col, 2000). Sin embargo, en la raza Merino, nosotros no encontramos correlación entre el número de cuerpos lúteos y el número de folículos chicos, medianos, grandes o totales al inicio del tratamiento de ovulación.

Se ha sugerido que el bloqueo gonadotropo mediante un tratamiento prolongado con antagonista de la GnRH (10 a 14 días), previo a la aplicación de FSH, posibilita incrementar el número y concentrar las ovulaciones, reducir su variabilidad entre animales y duplicar el número de corderos nacidos por donante (7 corderos por oveja donante) con una alta repetibilidad (Cognie, 1999; Cognie y col, 2003). A su vez, la administración endovenosa de 3 mg de LH a las 32-36 horas de finalizado el tratamiento progestacional, posibilita sincronizar la ovulación entre las 20-28 horas post aplicación, permitiendo realizar la inseminación artificial a tiempo fijo a las 48-50 horas PREIP (Cognie y col, 2003). En Francia, se ha empleado este tratamiento con resultados promisorios lográndose un mayor número de ovejas multiovuladas (>5 ovulaciones), con más de 10 embriones transferibles por oveja donante en la raza Lacaune. Sin embargo, una elevada respuesta ovulatoria (>30 cuerpos lúteos por oveja), se ha asociado con una menor tasa de fertilización y embriones transferibles (Tabla 2).

Tabla 2. Recuperación, tasa de fertilización y porcentaje de embriones transferibles según la tasa de ovulación múltiple en ovejas de raza Lacaune (Cognie y col, 2003).

Cuerpos lúteos	Ovejas Donantes	Huevos recuperados (%)	Huevos fertilizados (%)	Embriones transferibles (%)
5-9	26	60	84 b	69 a
10-14	39	62	93 a	76 a
15-19	41	62	89 a	79 a
20-24	17	67	85 ab	73 a
25-29	13	67	82 b	77 a
30 o +	18	53	72 c	47 c

(a vs. b, b vs. c) X^2 test; $P < 0.01$. (a vs. c) $P < 0.001$ en la misma columna.

Si bien con este tratamiento se ha logrado una mayor repetibilidad individual en la tasa de ovulación entre dos tratamientos sucesivos de ovulación múltiple, aún se mantiene una elevada variabilidad entre individuos.

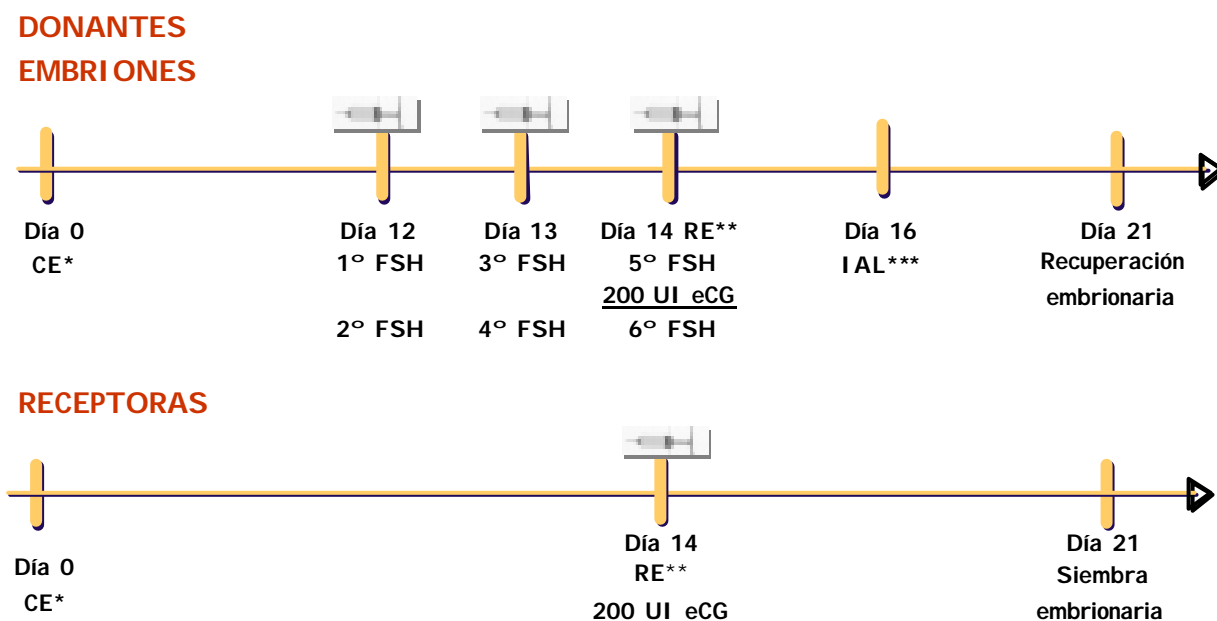
En la actualidad existen varios factores no bien esclarecidos, que controlan la foliculogénesis, el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la ovulación y la fertilización. Los avances que se logren en el entendimiento de sus funciones y sus interrelaciones, determinarán una mayor eficiencia de los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, reduciendo los costos e incrementando los beneficios de esta técnica.

4- Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donante y receptora

La sincronización de los estros de las receptoras mediante tratamiento progestacional se realiza en forma conjunta con las hembras donantes. El objetivo es lograr que ambas presenten el mismo día del ciclo estral en el momento de la recuperación y siembra de embriones.

Los análogos sintéticos de la progesterona, el FGA (acetato de fluorogestona) y el MAP (acetato de medroxiprogesterona), son comúnmente empleados en pesarios (esponjas intravaginales) para los tratamientos de sincronización de celos. Se aplican durante 14 días en el ovino y 17 días en el caprino. En Australia y Nueva Zelanda es muy frecuente la utilización de progesterona vía vaginal, empleando el CIDR (Control Interno de Liberación de Droga).

La gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) o gonadotropina coriónica equina (eCG) posee actividad FSH, y en menor medida, actividad LH. Se utiliza al final de los tratamientos con esponjas intravaginales con progestágenos para la sincronización de celos. En los ovinos y caprinos, se recomienda la colocación de una esponja intravaginal y la administración de eCG al momento de su retiro (Figura 1). La dosis de PMSG varía según la raza y el estado fisiológico reproductivo (valores indicativos: 200 a 400 UI).



* Colocación de esponjas intravaginales.

** Retiro de esponjas intravaginales.

*** Inseminación artificial laparoscópica.

Figura 1. Cronograma de tratamiento hormonal para la ovulación múltiple en ovejas Merino donantes y receptoras de embriones.

5- Fecundación de la hembra donante

La fecundación en las hembras donantes puede realizarse mediante servicio natural a corral o mediante inseminación artificial (IA), con semen fresco o congelado. El servicio a corral se realiza cada 12 horas, desde el comienzo del celo y hasta su finalización.

En el caso de emplearse la IA, ya sea con semen fresco o congelado, se recomienda el empleo de la técnica laparoscópica, debido a que la deposición del semen en los cuernos uterinos y en proximidad del sitio de fertilización, permite aumentar las tasas de fertilización, así como reducir las dosis de inseminación.

- *Dosis de inseminación*

Las siguientes son dosis de inseminación de referencia para la IA con *semen fresco* (en millones de espermatozoides):

- IA cervical: 800 (ovinos) - 400 a 600 (caprinos).
- IA laparoscópica: 80 (ovinos) - 100 (caprinos) (Baril y col, 1989; Vallet y Baril, 1990; Brebion y col, 1992).

La dosis seminal empleada en la IA laparoscópica con *semen congelado* en ovinos (Wolff y col, 1994) y caprinos (Vallet y Baril, 1990) es de 100 millones de espermatozoides.

- *Momento óptimo de realización de la IA*

En ovinos, es recomendable realizar la IA laparoscópica con *semen fresco* a las 32 horas de iniciado el celo (Brebion y col, 1992).

En el caso de utilizarse *semen congelado*, se puede realizar una inseminación a tiempo fijo entre las 40 a 55 horas PREIP (Evans y col, 1986; Wolff y col, 1994). En nuestra experiencia, hemos realizado la IA laparoscópica luego de la detección de estros. Las ovejas detectadas en celo a las 24 horas PREIP se inseminan 24 post celo y las que presentan celo a las 36 o 48 horas se inseminan a las 12 horas de detectadas en estro (Foto 2).

En caprinos, se recomienda realizar la IA laparoscópica con semen fresco entre las 20 y 24 horas post inicio del celo (Vallet y Baril, 1990). Si se utiliza semen congelado, es conveniente realizar la IA a las 46 horas PREIP (Fieni y col, 1990).

- Tasa de fertilización

La eficiencia de la fertilización en las hembras multiovuladas ha presentado resultados muy variables en función de la técnica de fertilización empleada, momento de inseminación y respuesta individual ovulatoria al tratamiento hormonal.

La fertilización de los ovocitos se puede realizar mediante servicio natural, IA cervical o laparoscópica. Se debe tener en cuenta que mediante el servicio natural o la IA por vía cervical en las donantes de alta respuesta ovulatoria (más de 10 a 12 ovulaciones) se obtiene una baja tasa de fertilidad, debido a la reducción del transporte espermático en el tracto reproductivo.

Los programas de inseminación a tiempo fijo (IATF) por laparoscopia con semen congelado para los tratamientos de ovulación múltiple son muy riesgosos y sólo deben ser utilizados cuando se conoce la distribución de celos de la población en particular, para el régimen hormonal y estación en la cual se desea trabajar. La eficiencia de fertilización con el empleo de semen congelado a tiempo fijo ha presentado resultados variables. Si bien Armstrong y Evans (1984) obtuvieron una fertilidad del 50%, en nuestra experiencia, la utilización de GnRH ha permitido obtener un porcentaje mayor de fertilización. Mediante la administración de un análogo de la GnRH (8 µg de Busereleina; Receptal), 36 horas PREIP, obtuvimos tasas de fertilización del 70-80% al realizar la IA indistintamente a las 42 o 55 horas PREIP (Wolff y col, 1994).

Sin embargo, se recomienda inicialmente realizar la inseminación laparoscópica, luego de detectado el celo. En nuestra experiencia, en la raza Merino, realizamos la IA con semen congelado sobre celo detectado y con una dosis de 100 millones de espermatozoides totales. Las ovejas detectadas en celo a las 24 horas PREIP se inseminan 24 post celo y las que presentan celo a las 36 o 48 horas se inseminan a las 12 horas de detectadas en estro, obteniendo un porcentaje de fertilización de 78.6%.

En caprinos, se obtuvieron porcentajes de fertilización del 32% (IA cervical) y 65% (IA laparoscópica) con semen fresco (Moore y Eppleston, 1979), y 70-75% con semen congelado por laparoscopia (Fieni y col, 1990).

La tasa de fecundación es muy dependiente del nivel de respuesta ovulatoria al tratamiento de estimulación. En las cabras Alpinas y Saanen, la fertilidad disminuye cuando la respuesta ovulatoria es elevada (>15 cuerpos lúteos, 49% vs. <15 cuerpos lúteos, 66%) (Baril y col, 1989). Esta misma observación se evidenció en ovinos lecheros (Brebion, sin publicar).

La fertilidad de la IA en las hembras multiovuladas es menor respecto a la inseminación de animales testigo no tratados (Moore y Eppleston, 1979; Armstrong y Evans, 1984). La tasa de fecundación no se puede incrementar por medio de un mayor número de inseminaciones o elevando la concentración espermática de la dosis inseminante (Vallet y col, 1991; Brebion y col, 1992).

6- Colecta de embriones

La metodología empleada para la obtención de embriones consiste en inyectar un medio líquido para producir una corriente de arrastre (lavado o flushing) a través de los cuernos uterinos. Se utiliza un medio comercial en base a PBS (Solución Buffer Fosfato), al que se le debe adicionar un 10% de suero adulto bovino, ovino o caprino inactivado. Para la obtención de suero, se sangra en forma aséptica con material esterilizado. El *suero* se centrifuga a 2000 g durante 15 minutos. Se toma el sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación. Se filtra por membrana de 0.22 µm. La inactivación de la proteína complemento se realiza en baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. El suero filtrado inactivado se puede conservar durante un año a -20 °C.

En ovejas, la colecta embrionaria se realiza en los días 7mo u 8vo PREIP. Debido a que el desarrollo embrionario inicial en caprinos presenta un retraso de 12 a 24 horas, la colecta de embriones se realiza en los días 8vo o 9no PREIP (Tabla 3).

Tabla 3. Desarrollo embrionario comparativo entre ovejas y cabras en diferentes momentos después del retiro de las esponjas intravaginales (Adaptación de Moore, 1980).

Días post retiro de las esponjas	Oveja	Cabra
7	Mórula	Mórula
8	Mórula compacta blastocisto	Mórula
9	Blastocisto expandido Blastocisto fuera de la zona pelúcida	Mórula compacta Blastocisto Blastocisto expandido
10	Blastocisto fuera de la zona pelúcida	Blastocisto fuera de la zona pelúcida

Las colectas embrionarias se realizan en los días mencionados debido a los siguientes fundamentos:

- Los embriones están en el tercio superior de los cuernos uterinos.
- Presentan la membrana pelúcida, necesaria como barrera sanitaria.
- La congelación se realiza en estado de mórula compacta o blastocisto.

Las técnicas para la colecta de embriones en los rumiantes menores son:

6a) Técnica quirúrgica

6b) Técnica no quirúrgica

Estas intervenciones se llevan a cabo bajo anestesia general. Es indispensable que los animales no reciban alimento ni agua en las 24 horas previas a la operación. Se utiliza un tranquilizante intramuscular (2 mg/10 kg Xilazina 2%) y un anestésico endovenoso (50 mg/10 kg Thiopental sódico). También es posible realizar una combinación de Xilazina (2 mg/10 kg Xilazina 2%) y Ketamina (15 mg/10 kg, Clorhidrato de Ketamina), administrados ambos en forma intramuscular (0.4 cc y 2 cc, respectivamente). Asimismo se puede aplicar un anestésico local en el área quirúrgica (1 cc, Lidocaína 2%).

6a- Técnica quirúrgica

La hembra se ubica en un plano inclinado en una camilla (cabeza hacia abajo). Se rasura y se desinfecta el campo operatorio. Se realiza una laparotomía media de 5 a 7 cm, y a 3 cm por delante de la ubre.

Antes de comenzar con la recuperación embrionaria se realiza una determinación de la respuesta ovulatoria (recuento del número de cuerpos lúteos), mediante exteriorización de los ovarios o por observación laparoscópica. En base al número de estructuras colectadas se determina el porcentaje de recuperación embrionaria.

La recuperación embrionaria consiste en la colocación de una sonda (K33) que en su extremo dispone de una aguja (50/20) con punta no traumática y dos perforaciones laterales y una central. Se realiza una punción en la unión útero tubárica y se enhebra la sonda en el interior de la luz del cuerno uterino (1 cm), fijando la misma por medio de un clamp vascular o ligadura (Fotos 3 y 4). Aproximadamente a un par de cm de la bifurcación de los cuernos uterinos, se realiza una segunda punción, para la inyección de 20 cc de PBS a 38 °C (Fotos 5 y 6). De esta manera se produce una corriente de arrastre que fluye hacia la unión útero tubárica, donde está ubicada la sonda, y el medio de colecta es recuperado en un Erlenmeyer estéril previamente entibiado (Foto 7). Se procede de igual manera con el otro cuerno uterino.

Finalizada la recuperación embrionaria, se realiza la sutura de los planos quirúrgicos y se administran antibióticos.

También es posible ubicar una sonda de Foley en la bifurcación de los cuernos uterinos, recuperando el líquido de colecta por la misma sonda.

El medio recuperado es volcado en cajas de Petri cuadrículadas para proceder a la búsqueda de embriones bajo lupa (10X).

En la primera recuperación embrionaria, la técnica quirúrgica permite alcanzar una eficiencia media del 60%. El inconveniente que presenta es la formación de adherencias post quirúrgicas que reducen la eficiencia en la obtención sucesiva de embriones. Nosotros hemos obtenido eficiencias del 66, 41 y 35% para la 1ra, 2da y 3ra intervención.

6b- Técnica no quirúrgica

La técnica no quirúrgica o por laparoscopia fue desarrollada por Mc Kelvey y col. (1986) en ovinos, y por Vallet y col. (1987) en caprinos. Se realizan tres punciones (con trócares) en la cavidad abdominal. La primera punción permite introducir el laparoscopio; la segunda, una sonda de tres vías (cada vía corresponde a: 1) entrada del PBS, 2) salida del PBS e 3) insuflación del balón); y la tercera, una pinza no traumática. Esta pinza permite la manipulación del tracto reproductivo, a fin de hacer avanzar la sonda por la luz uterina y fijar la unión útero tubárica durante el flujo del PBS.

Esta técnica requiere un muy buen entrenamiento y su costo es elevado debido a la necesidad de disponer de un laparoscopio. Presenta una menor eficiencia en la recuperación de embriones (60%). La obstrucción de la sonda por coágulos o mucus representa a veces una gran dificultad; pero su ventaja es que disminuye las adherencias y por lo tanto no se disminuye el porcentaje de recuperación embrionaria en intervenciones sucesivas. Vallet y col. (1987) obtuvieron tasas de recuperación del 59, 58 y 68% en caprinos.

El tiempo medio para realizar una recuperación de embriones es de aproximadamente 15 a 20 minutos (quirúrgica) y 20 a 30 minutos (por laparoscopia) por hembra.

Independientemente de la técnica de recuperación embrionaria utilizada, y si se desea contar con la seguridad de que las hembras donantes no queden preñadas por embriones no recuperados, se recomienda la administración de prostaglandinas PF2 alfa al final de las intervenciones (50 µg de Cloprostenol).

7- Búsqueda de embriones

El medio de lavado recolectado es vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realiza bajo lupa con platina térmica a 38 °C (Foto 8). Se recomienda efectuar siempre una segunda lectura de la placa. A medida que se identifican los embriones, los mismos son aspirados mediante micropipeta y colocados en una caja de Petri con medio de conservación enriquecido con suero al 20% a resguardo de la luz y a temperatura de laboratorio. Una vez finalizada la búsqueda, se procede a la clasificación de los embriones. De ser posible es importante utilizar campana y aire filtrado. Cabe recordar que se debe trabajar en condiciones estrictas de esterilidad.

8- Clasificación de embriones

La clasificación de los embriones se realiza en base a sus aspectos morfológicos y con 10 a 40 aumentos. Una micropipeta o una fina pipeta de vidrio permitirá mover los embriones, para poder observarlos desde distintos ángulos. Se debe observar la integridad de la membrana pelúcida y su esfericidad. El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera hasta un máximo de 24 horas de retraso (Figura 2). Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración. Se sugiere consultar la Blastografía del desarrollo embrionario temprano en el bovino superovulado (Atlas Embrionario–IMV).

En algunos embriones, se puede observar desprendimiento parcial de células en el espacio perivitelino. Esta característica es tolerable si el resto conforma una masa celular uniforme y sin opacidad. Cuando los embriones son dudosos, se recomienda realizar una segunda observación a las dos horas. Este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presentan diferencias significativas en la sobrevivencia embrionaria (Bari y col, 2003) (Tabla 4) cuando se transfieren embriones de calidad regular respecto a la calidad buena o excelente (Anexo 1). Esta diferencia es mayor cuando se procede a la siembra de embriones que fueron congelados o vitrificados en nitrógeno líquido.

Tabla 4. Tasa de sobrevivencia de embriones de diferentes grados de calidad en ovinos de la raza Scottish Blackface (Bari y col, 2003).

Grado embrionario	Embriones transferidos (n)	Sobrevivencia embrionaria (%)
Grado 1	825	75.6a
Grado 2	550	73.8a
Grado 3	114	61.4b
Grado 4	24	37.5b

Valores con diferente letra son estadísticamente significativos (test X^2 ; $P < 0.05$)

Se sugiere consultar el Atlas de Winterberger-Torres y Sevellec (1987) sobre morfología y calidad embrionaria, los Ejemplos de desarrollo y calidad embrionaria en embriones bovinos y la Blastografía del desarrollo embrionario temprano en el bovino superovulado (Atlas Embrionario–IMV).

La tasa de sobrevivencia embrionaria no es afectada por el día en que se realiza la colecta embrionaria (día 5 o 6 post estro). En los estadios embrionarios normales para los días correspondientes a su colecta (día 5, mórula; día 6, blastocisto) se presentan valores similares de sobrevivencia embrionaria ovina (74%) (Bari y col, 2003). Sin embargo, blastocistos colectados en día 5 tienen una alta sobrevivencia respecto a mórulas retardadas colectadas en día 6.

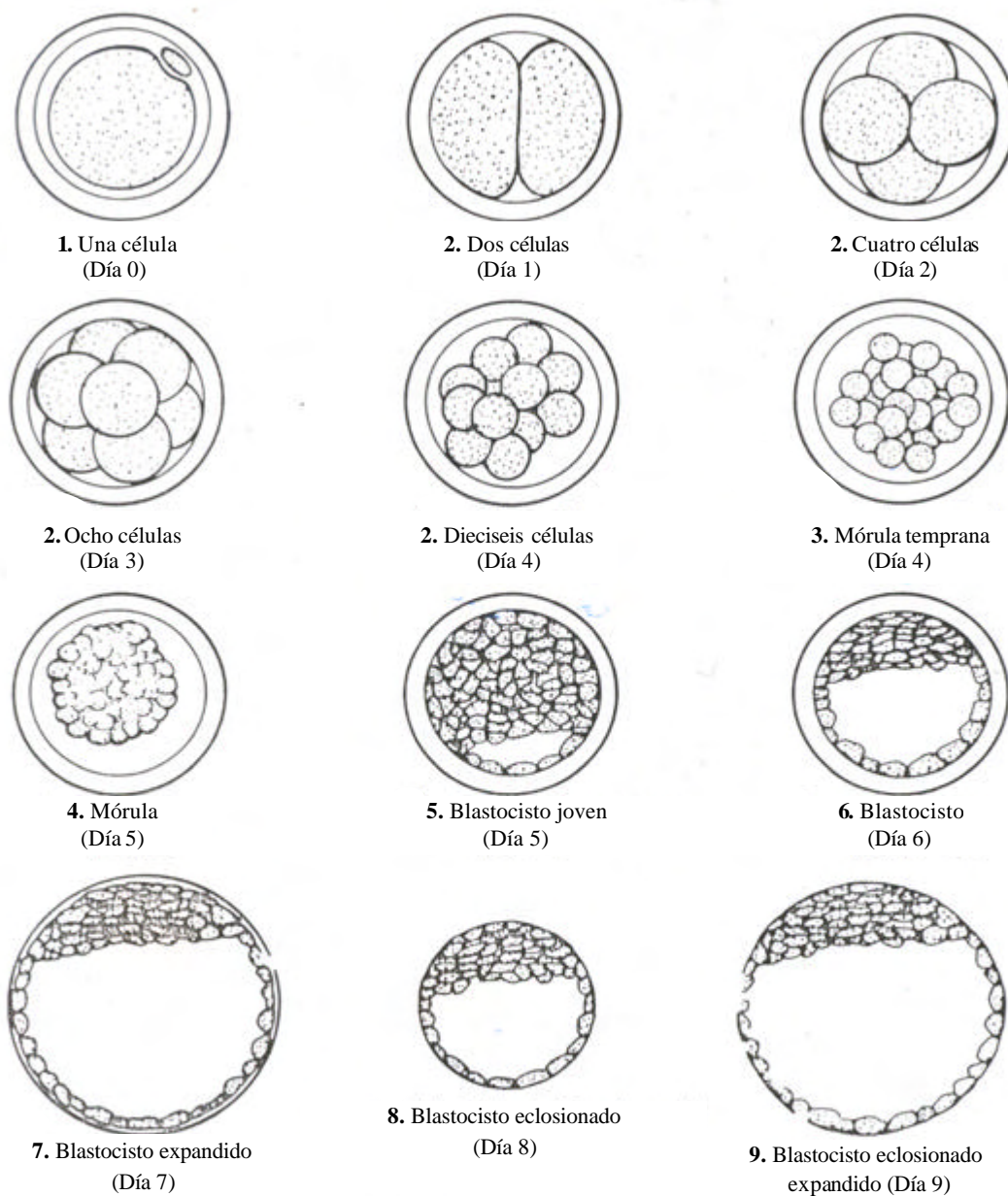


Figura 2. Esquema de la cronología del desarrollo embrionario en la oveja (**días post celo**). El código para el estadio de desarrollo es numérico. **1.** Identifica un ovocito no fertilizado o un embrión de una célula. **2.** Identifica embriones con 2 a 16 células. **3.** Identifica una mórula temprana. **4-9.** Identifica estadios embrionarios de compactación.

9- Siembra de embriones

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la recuperación de los embriones y su siembra sea inmediato y no supere las 2 horas en el medio de conservación embrionario.

Si se trata de embriones previamente congelados, el tiempo máximo entre descongelamiento y siembra se reduce a 20 o 30 minutos.

El sitio habitual de siembra de los embriones es el cuerno ipsilateral del ovario con cuerpo lúteo.

Los 2 métodos más utilizados en la siembra de embriones son el quirúrgico o no quirúrgico por laparoscopia (González y col, 1991). En ambos casos se procede a realizar una punción en la cara dorsal del cuerno uterino y en su tercio superior. Mediante una micropipeta, se deposita el embrión en la luz uterina (acondicionado en 10 µl de PBS).

Existe una técnica combinada en la cual se visualiza el cuerno uterino por laparoscopia, se realiza una pequeña incisión de 1 cm en la línea media abdominal, y mediante una pinza, se exterioriza el cuerno uterino para realizar la siembra embrionaria (Siembra semi-quirúrgica de embriones) (Fotos 9 y 10).

En las cabras lecheras, se ha determinado una tasa superior de sobrevivencia embrionaria cuando se realiza una siembra doble (Moore y Eppleston, 1979; Armstrong y col, 1983; Tervit y col, 1983). En los ovinos, la eficiencia global (corderos logrados/embriones sembrados) es mayor cuando se siembra un embrión por hembra receptora (Cseh y Seregi, 1993).

La tolerancia en el tiempo de sincronización de estro entre donante y receptora es de ± 1 día. A mayor sincronización, mayor es la eficiencia de la transferencia (Rowson y Moor, 1966).

Cabe consignar que se ha mencionado el "efecto donante" como la variabilidad que se puede presentar en la tasa de sobrevivencia de embriones (0 a 78%) para una igual calidad embrionaria entre distintas madres (Heyman y col, 1987).

Es importante realizar un examen laparoscópico o visual de los ovarios de las receptoras, con el fin de asegurarse que se dispone de hembras con uno o dos cuerpos lúteos correspondientes al día 6 o 7 del ciclo estral. Asimismo se debe tener presente, al realizar la selección de las receptoras, que la sobrevivencia embrionaria está influenciada por el número de cuerpos lúteos. Armstrong y col. (1983) obtuvieron valores del 52, 63 y 75% de sobrevivencia embrionaria con recipientes con 1, 2 y 3 cuerpos lúteos. La técnica de laparoscopia facilita la realización de una buena clasificación de las receptoras por su respuesta ovulatoria.

En ciertas oportunidades y en especial cuando se trata de cabras, se presentan receptoras con folículos quísticos o cuerpos lúteos regresados. Estas hembras no deben ser utilizadas como receptoras.

En referencia a la siembra embrionaria por vía cervical, la misma es de muy baja utilización debido a la dificultad que presenta el paso del cérvix (Lewalski y col, 1991; Flores-Foxworth y col, 1992).

Es muy importante considerar el tiempo entre la recuperación, búsqueda y clasificación hasta la siembra de los embriones. Debido al trabajo que implica la realización de un programa de TE, debe estar muy bien organizado y coordinado para obtener óptimos resultados.

10- Conservación de embriones

10a- Conservación por enfriamiento a 5 °C

La posibilidad de conservación de embriones facilita la difusión de material de alto valor genético a nivel local o regional. Para un transporte a corta distancia, la refrigeración a 5 °C permite su conservación por 24 horas, en medio de cultivo (Ovum Culture Medium). La velocidad de enfriamiento se realiza a razón de 1 °C por minuto.

El calentamiento de los embriones se realiza a 0.6 °C por minuto o bien se colocan directamente a 37 °C en PBS enriquecido. Se examinan a la lupa, se seleccionan y se siembran inmediatamente. El porcentaje de sobrevivencia varía entre el 35 al 48% (Bilton y Moore, 1976; Driancourt y col, 1988).

10b- Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido

En animales domésticos, los primeros resultados se publican en la década del 70 (Whittingham y col, 1972; Wilmut y Rowson, 1973). En 1976 se publicaron los primeros trabajos en caprinos (Bilton y Moore, 1976) y en ovinos (Willadsen y col, 1976).

Al igual que el semen de estas especies, es posible realizar el congelamiento de sus embriones y mantenerlos en nitrógeno líquido por períodos prolongados. Este método de conservación ha permitido la comercialización internacional y por ende la difusión a nivel mundial del material genético.

El procedimiento consiste en someter las células embrionarias a la incorporación de medios crioprotectores. Estos compuestos (polialcoholes) son capaces de penetrar en las células por difusión simple y su función es disminuir la formación de los cristales de agua por medio del descenso del punto de congelación. El medio que contiene los embriones (extracelular) es más rico en agua que el medio intracelular. Por lo tanto, al comienzo del congelamiento, la formación de los primeros cristales de hielo se produce en el medio extracelular, generando la salida de agua intracelular hacia el exterior, por difusión, y disminuyendo la formación de hielo intracelular. Los tiempos y la velocidad del proceso de congelamiento determinan la futura viabilidad del embrión.

Para ambas especies se ha determinado la mayor eficiencia de sobrevivencia embrionaria post descongelamiento cuando se emplea etilenglicol, respecto al glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) (ovinos, Tervit y Goold, 1984; caprinos, Le Gal y col, 1993). Como valores de referencia, es posible obtener porcentajes de preñez entre el 39 al 55% (Tervit y Goold, 1984; Hunton y col, 1985; Le Gal y col, 1993).

La congelación se realiza con embriones de calidad excelente o muy buena, en estado de mórula compacta o blastocisto expandido (día 6to o 7mo post estro). El estadio de blastocisto es más resistente al congelamiento, debido a que una parte de las células puede sufrir severos daños, pero sin que se limite su futuro desarrollo.

La selección de los embriones antes de su congelamiento es de vital importancia, debido a que su estado determina sus posibilidades de sobrevivir a la descongelación. Los blastocistos sin membrana pelúcida pueden ser congelados sin afectarse su sobrevivencia. Las limitantes en este caso son de tipo sanitario.

La conservación de embriones en nitrógeno líquido puede llevarse a cabo mediante la técnica de congelamiento o vitrificación.

Técnica de congelamiento

Una vez recuperados los embriones, se seleccionan y colocan en baños sucesivos de 10 minutos en soluciones crecientes de etilenglicol (0.5 M, 1 M, 1.5 M) (Anexo 2) en PBS con 20% de suero fetal bovino a temperatura ambiente. Durante este período se produce encogimiento celular por pérdida de agua y lenta reexpansión por ingreso del crioprotector.

Finalizada esta etapa, se colocarán en pajuelas de 0.25 cc. Es importante rotular las pajuelas, indicando la hembra donante, raza, número de embriones y fecha. Los embriones se acondicionarán en la pajuela con la solución de 1.5 M etilenglicol en PBS, separados hacia ambos extremos por un espacio de aire y una columna de PBS + suero. A continuación, se sella la pajuela con alcohol polivinílico.

Renard y col. (1982) presentaron la posibilidad de introducir dos cámaras de sucrosa 0.25 M en PBS en ambos extremos de la pajuela, quedando los embriones en PBS + etilenglicol 1.5 M en una cámara central (separada de las anteriores por cámaras de aire). Una vez descongelada la pajuela, se agita para que se produzca la unión de las cámaras. Los embriones no se observan a la lupa, sino que todo el contenido de la pajuela se transfiere a la hembra receptora. Este método es rápido y se logra una aceptable sobrevivencia embrionaria (55 a 65%) (Tervit y Goold, 1984; Hunton y col, 1985; Heyman y col, 1987; Le Gal y col, 1993).

Una vez acondicionados los embriones, las pajuelas se disponen en el congelador programable o bien se puede utilizar un congelamiento manual. Para éste es necesario disponer de un cilindro de acero, donde se ubican las pajuelas y el sensor de un termómetro, unido a un

vástago agujereado (con barra en T) que permita graduar el descenso del conjunto en la boca del termo de nitrógeno.

El tiempo entre colecta e inicio del congelamiento no debe superar los 40 minutos.

El descenso de temperatura se realiza a razón de 1 a 3 °C por minuto hasta -7 °C. A los 30 segundos de permanencia en esta temperatura, se procede a realizar el seeding (inducción a la cristalización). El seeding se realiza con una pinza enfriada en nitrógeno líquido, mediante contacto de 2 a 3 segundos sobre cada uno de los bordes de la fracción de aire situada por encima de la columna que contiene los embriones. Su función es inducir la formación temprana de cristales de hielo, de tal manera que la tasa de enfriamiento es menor, las células disponen de más tiempo para deshidratarse y se minimiza el daño celular (de la Vega y Wilde, 1991).

Posteriormente, la temperatura se mantiene a -7 °C durante 10 minutos (tiempo de equilibramiento), al término de los cuales, se continúa el descenso térmico a razón de 0.3 °C por minuto hasta -35 °C. El tiempo de estabilización a -35 °C es de 15 minutos. Luego, las pajuelas se transfieren al termo de nitrógeno líquido y se sumergen en este medio a -196 °C.

Técnica de descongelamiento

El descongelamiento de los embriones se realiza en baño termostático de agua a 37 °C durante 30 segundos. Posteriormente, se realiza la extracción progresiva del crioprotector en etapas sucesivas (5 a 10 minutos cada una), sumergiendo los embriones en placas de Petri con concentraciones decrecientes de etilenglicol (1 M, 0.5 M) en base a PBS + suero 20%, y luego se los coloca en una placa con PBS + suero. Seguidamente se realiza una evaluación de las características morfológicas. En este examen se lleva a cabo una selección de los embriones debido a los daños que se presentan por el proceso de congelamiento/descongelamiento. Como valor de referencia, se acepta entre un 10 y un 30% de embriones dañados.

Otra técnica de remoción del crioprotector al descongelamiento, consiste en el empleo de sucrosa. Esta sustancia, debido a su alto peso molecular, no puede pasar al interior de los embriones y genera, por lo tanto, un medio hiperosmótico extracelular que ejerce una función de difusión masiva del crioprotector hacia el exterior de los embriones. Asimismo produce retención de agua en el medio extracelular impidiendo que ésta ingrese a mayor velocidad que la salida del crioprotector. En la práctica, los embriones descongelados se colocan en una solución de sucrosa 0.25-0.5 M en PBS + suero durante 5 a 10 minutos, y luego se realizan 3 pasajes sucesivos de 5 a 10 minutos en PBS + suero.

Se recomienda que ante la compra de embriones se solicite al laboratorio que realizó el congelamiento de embriones, el envío del protocolo de congelamiento y de descongelamiento y el certificado sanitario correspondiente.

En la especie ovina los porcentajes de embriones viables post descongelamiento son superiores para los blastocistos respecto a las mórulas (67 vs. 31%) (de Paz y col, 1994). En la especie caprina se ha observado una mayor sobrevivencia de los embriones en estado de

blastocisto expandido o sin pelúcida (Chemineau y col, 1986; Li y col, 1990). El inconveniente de realizar el congelamiento en ese estadio embrionario es la restricción sanitaria para los embriones sin membrana pelúcida.

En ovinos, hemos empleado la técnica de congelamiento lento en cilindro sobre vapores de nitrógeno, acondicionados en pajuelas, en una cámara central de etilenglicol 1.5 M en PBS + suero y con la incorporación de las cámaras de sucrosa 0.25 M en ambos extremos. El descongelamiento se realizó en forma rápida en baño de agua, procediéndose al mezclado de las cámaras de la pajueta en una pequeña caja de Petri. Los embriones fueron clasificados bajo lupa, sembrándose inmediatamente 2 embriones por hembra receptora. Con esta metodología hemos obtenido tasas de preñez del 30 al 40%.

En caprinos, si bien hemos empleado una metodología de congelamiento similar a la mencionada para los ovinos, obtuvimos mejores resultados al acondicionar los embriones en PBS enriquecido con BSA al 4%; y mediante el descongelamiento en una solución de sucrosa 0.25 M en PBS y 3 pasajes sucesivos en PBS durante 5 a 10 minutos. Se sembraron 2 embriones por receptora, obteniéndose una tasa de preñez del 33%.

Técnica de vitrificación

Otra técnica de conservación a bajas temperaturas es la *vitrificación*. El principio físico se basa en someter a los embriones a una alta concentración de crioprotector en muy bajos volúmenes de solución, de manera de evitar la formación de cristales de hielo.

El procedimiento para la vitrificación se realiza a temperatura de laboratorio (25 °C), en tres pasos sucesivos de inmersión de los embriones en soluciones crecientes de glicerol y etilenglicol, en base de PBS con 20% de suero fetal bovino (Traldi y col, 1999; Martínez y col, 2006). Brevemente: 1) Glicerol 10% durante 5 minutos, 2) Glicerol 10% + Etilenglicol 20% durante 5 minutos y 3) Glicerol 25% + Etilenglicol 25% durante 30 segundos (Anexo 3). A continuación los embriones son aspirados en tips con 1 ?l de medio (2 embriones/tip) y sumergidos en criotubos con nitrógeno líquido (Gibbons y col, 2008; 2009).

La *desvitrificación* se realiza “al aire” a 37 °C durante 6 segundos. Inmediatamente los embriones son colocados durante 5 minutos en una solución de glicerol 12.5% + etilenglicol 12.5% + sucrosa 0.5 M en base de PBS con 20% de suero fetal bovino. Posteriormente se colocan a temperatura ambiente en dos soluciones de 0.5 M y 0.25 M de sucrosa (5 minutos por solución). Por último, los embriones son lavados 2 veces en PBS + suero (2.5 minutos por solución) (Gibbons y col, 2008) (Anexo 3). Mediante esta metodología en ovinos *in vitro* hemos obtenidos una tasa de protusión embrionaria del 50% para las mórulas y 81.6% para los blastocistos (Gibbons y col, 2008); y en caprinos, del 61% para blastocistos (Gibbons y col, 2009). En la especie ovina hemos obtenido una tasa de sobrevivencia embrionaria del 42% (mórulas) y 47% (blastocistos) y una tasa de preñez del 50% para ambas edades embrionarias (2 embriones/receptora) (Gibbons y col, 2010). En caprinos, mediante la vitrificación de blastocistos, hemos obtenido una tasa de sobrevivencia embrionaria entre el 64 al 70% y un

porcentaje de preñez entre el 64 al 86% (2 embriones/receptora) (Traldi y col, 2009; Gibbons y col, 2010). Esta técnica no es recomendable para vitrificar mórulas caprinas debido a su baja eficiencia reproductiva.

Eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones

A continuación se presentan valores medios de referencia de la eficiencia de las diferentes etapas de la ovulación múltiple y TE (tratamiento convencional FSH):

- Número de cuerpos lúteos por hembra donante: ovino, 11; caprino, 14-15.
- Número de embriones + ovocitos recuperados por vía quirúrgica: 60 a 70% en ambas especies.
- Tasa de fertilización por IA laparoscópica: ovino, 80% ; caprino, 75%.
- Tasa de selección de embriones para congelamiento: 80 a 90% en ambas especies.
- Tasa de selección de embriones post descongelamiento: 70 a 90% en ambas especies.
- Porcentaje de preñez (Siembra directa): 70% en ambas especies.
- Número de crías nacidas por hembra donante tratadas al azar:
 - TE inmediata: Ovinos: 4 corderos/oveja donante.
Caprinos: 5 cabritos/cabra donante.
 - TE congelados: Ovinos: 2 a 3.2 corderos/oveja donante.
Caprinos: 2 a 3.6 cabritos/cabra donante.

En trabajos realizados en el **INTA de Bariloche** hemos obtenido los siguientes resultados en ovinos de raza Merino y en cabras de raza Angora y Criolla:

Número promedio de CL: Ovinos: 13 (a) – 17.5 (b).
Caprinos: 8.6 (b).

Recuperación quirúrgica de embriones: Ovinos-caprinos: 60%.

Tasa de preñez mediante TE por técnica quirúrgica inmediata: Ovinos: 64%.
Caprinos: 60%.

Tasa de preñez mediante embriones vitrificados: Ovinos : 50%.
Caprinos: 64%.

(a) Tratamiento con 80 mg de pFSH (NIH Folltropin-V) + 200 UI PMSG.

(b) Tratamiento con 200 mg de pFSH (NIH Folltropin-V) + 200 UI PMSG.

Partición de embriones

La posibilidad de realizar la partición de embriones permite incrementar la eficiencia a valores de 94 al 131% (corderos nacidos cada 100 embriones partidos) (Gatica y col, 1984; Chesne y col, 1987). Para realizar esta técnica es necesario disponer de un micromanipulador cuyo costo limita su empleo. La partición de embriones brinda la interesante posibilidad de disponer de animales gemelos para realizar investigaciones en genética.

La eficiencia en el porcentaje de preñez cuando se realiza la transferencia de embriones partidos y congelados es baja (5.6%) (Shelton, 1992).

Garantía sanitaria de la transferencia de embriones

A pesar de las medidas sanitarias actualmente existentes, el riesgo de introducir enfermedades a través de la incorporación de animales vivos, es muy alto. La TE reduce considerablemente este riesgo, debido a la barrera natural que presentan los embriones contra bacterias y virus (Stringfellow y col, 1991). Se ha demostrado la posibilidad de obtener embriones sin riesgo sanitario de madres infectadas con el virus de la Lengua azul (BTV). Por lo tanto es posible recuperar el material genético de un plantel infectado.

La inmunidad pasiva que aporta la madre receptora confiere al feto una sanidad invaluable, más aún cuando los embriones son exportados a países con enfermedades exóticas para el país de origen. Los costos de cuarentenas, de transporte y las dificultades de adaptación de los animales (condiciones climáticas, alimentarias y sanitarias), brinda a la TE una multiplicidad de beneficios comerciales adicionales.

La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) tiene como objetivo el intercambio y divulgación de los adelantos científicos en la TE y las tecnologías afines. Su comité de importaciones y exportaciones realiza la difusión de información técnica y científica para la formulación de las regulaciones sanitarias en el comercio de embriones. La IETS ha realizado una importante publicación de referencia sobre las normas generales de la TE (International Embryo Transfer Society, 1990).

Conclusiones Generales

La TE puede incrementar el número de crías de una hembra genéticamente superior, permitiendo obtener en promedio 4 crías por tratamiento de ovulación múltiple. Los recientes avances en el incremento de la eficiencia reproductiva en la TE han ampliado la posibilidad de su utilización en los programas de mejoramiento genético aumentando la difusión de los genes de las ovejas de alto valor productivo. Futuras investigaciones serán necesarias para reducir los costos e incrementar el número de crías por oveja donante para facilitar su aplicación comercial, como se ha logrado en la especie bovina.

No cabe duda que actualmente la TE es el método más seguro en el aspecto sanitario, para realizar la importación de los diferentes biotipos de alta producción. El incremento del comercio internacional de material genético mediante la TE demuestra la importancia que tiene esta técnica como reaseguro sanitario frente a las enfermedades exóticas y como herramienta del mejoramiento para la producción animal.

Bibliografía

- Alberio R, Iovanitti B, Vívoli C. 1993. Superovulación de ovejas Merino Australiano por medio de FSH ovina o porcina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 13 supl. 1: 59 (abstr.).
- Armstrong DT, Evans G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31-42.
- Armstrong DT, Evans G. 1984. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *J. Reprod. Fert.* 71: 89-94.
- Armstrong DT, Miller BG, Walton EA, Pfitzner AP, Warnes GM. 1982. Endocrine response and factors which limit the response of follicles to PMSG and FSH. Embryo transfer in cattle, sheep and goats. pp 8-15, Eds. Shelton J, Trounson AO, Moore NW. *Aust. Soc. Reprod. Biol.*, Sydney.
- Armstrong DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Seamark RF. 1983. Superovulation treatment and embryo transfer in Angora goats. *J. Reprod. Fert.* 67: 403-410.
- Bari F, Khalidb M, Haresign W. 2003. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology* Volume 59: 1265-1275.
- Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet JC. 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthyg.* 24: 101-115.
- Baril G, Remmy B, Lebouef B, Vallet JC, Beckers JF, Saumande J. 1992. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. 8th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 126 (abstr.).
- Baril G, Vallet JC. 1990a. Effect of seasons on embryo production in dairy goat hand mated or cervically inseminated after superovulated treatment. 6th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 118 (abstr.).
- Baril G, Vallet JC. 1990b. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. *Theriogenology* 34: 303-311.
- Bilton R J, Moore NW. 1976. In Vitro culture, storage and transfer of goats embryos. *Aust. J. Biol. Sci.* 29: 125-129.
- Brebion P, Baril G, Cognie Y, Vallet JM. 1992. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann. Zootech.* 41: 331-339.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Cognie Y, Chupin D, Saumande J. 1986. The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. *Theriogenology* 25: 148 (abstr.).
- Cognie Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51: 105-116.
- Corteel JM, Lebouef B, Baril G. 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Ruminant Research* 1: 19-35.
- Cseh S, Seregi J. 1993. Practical experiences with sheep embryo transfer. *Theriogenology* 39: 207.

- Chemineau P, Procureur R, Cognie Y, Lefevre PC, Locatelli A, Chupin D. 1986. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology* 26: 279-290.
- Chesne P, Colas G, Cognie Y, Guerin Y, Sevellec C. 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection and transfer. *Theriogenology* 27: 379-387.
- de la Vega AC, Wilde OR. 1991. Fundamentos biológicos de la criopreservación. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 11 (2): 151-165.
- de Paz P, Sánchez AJ, Fernández, Carbajo M, Dominguez CA, Chamorro CA, Anel L. 1994. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *Theriogenology* 42: 327-338.
- Donaldson L. 1984. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryo correlated with total embryos. *Theriogenology* 21: 517-524.
- Driancourt MA, Lorentz R, Chupin D, Webb R, Wilmut Y. 1988. Survival of ovine embryos stored at 4 °C for 24 hours. *Theriogenology* 30: 441-446.
- Evans G, Armstrong DT. 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fert.* 70: 47-53.
- Evans G, Holland MK, Nottle HB, Sharpe PH, Armstrong DT. 1984. Production of embryos in sheep using FSH preparations and laparoscopic intrauterine insemination. In *Reproduction in sheep*. Eds. Lindsay DR, Pearce DT. Aust. Acad. Sci. and Aust. Wool Corp., Canberra. pp 313-315.
- Evans G, Jabbour HN, Moore NW. 1986. Time of intrauterine insemination of superovulated ewes using fresh and frozen semen. 8th Ann. Conf. of Aust. Soc. Reprod. Biol., Brisbane, Australia, 1: 18.
- Fieni F, Buggin M, Tainturier D, Beckers JF, Bach-Lijour B, Bruvas JF, Daubie M. 1990. L'insemination artificielle intra-uterine, transperitoneale chez la chevre. *Recuell de Medicine Veterinaire* 166: 479-484.
- Flores-Foxworth G, Mc Bride BM, Kraemer DC, Nuti LC. 1992. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology* 37: 213 (abstr.).
- Gatica R, Boland MP, Crosby TF, Gordon Y. 1984. Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology* 21: 555-560.
- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Silvestre P, Cueto M. 2008. Vitrificación de embriones ovinos en tips. *Memorias de las Primeras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal-INITRA*. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. 24-26 de septiembre. Buenos Aires, Argentina.
- Gibbons A, Traldi A, Silva ROC, Catto DR, Pugliesi D, Cueto M, Pereyra Bonnet. 2009. Eficiencia reproductiva de embriones caprinos vitrificados en tips de micropipetas. *Memorias del VI CONGRESO ALEPRyCS, XV CONGRESO NACIONAL AMTEO y XXIV CONGRESO NACIONAL AMPCA*. Querétaro, Mexico (CD-ROM) p 81.
- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Cueto M. 2010. Cryotips: A simple vitrification technique for sheep and goat embryos. 36th Annual Conference of the IETS/23rd Annual Meeting SBTE. Córdoba, Argentina. January 9-13.

- González R, García Vinent JC, Gibbons A, Cueto MI. 1991. Laparoscopic embryo transfer in Merino Sheep in Patagonia (Argentina). XXIV World Vet. Congress, Río de Janeiro, Brasil.
- González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero M J, Lopez-Sebastian A. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54: 1055-1064.
- Heyman Y, Vincent C, Garnier V, Cogne Y. 1987. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Vet. Rec.* 24: 83-85.
- Hunton JR, Maxwell WMC, Ryan JP. 1985. Effect of addition and removal of glycerol and method of transfer on viability of sheep embryos. *Cong. of Aust. Soc. Reprod. Biol.* 29 (abstr.).
- International Embryo Transfer Society 1990. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Eds. Stringfellow DA, Seidel SM. 2° ed. USA, Champaign. pp 79.
- Jabbour HN, Ryan JP, Evans G, Maxwell WMC. 1991. Effects of season, GnRH administration and Lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of Merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fert. Dev.* 3: 699-707.
- Le Gal F, Baril G, Vallet JC, Lebouef B. 1993. In vivo and In vitro survival of goat frozen embryos with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology* 40: 771-777.
- Lewalski H, Soonen A, Meinecke-Tillman S, Meinecke B. 1991. Transcervical intrauterine embryo transfer in sheep. 7th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Cambridge, 1: 160 (abstr.).
- Li R, Cameron AWN, Batt PA, Trounson AO. 1990. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fert. Dev.* 2: 345-350.
- Martinez AG, Valcarcel A, Furnus CC, De Matos DG, Iorio G, De Las Heras MA. 2006. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Ruminant Research* 63: 288-296.
- Mc Kelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25: 855-865.
- Moor RM, Osborn JC, Crosby IM. 1985. Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fert.* 74: 167-172.
- Moore ER. 1980. Procedures and results obtainable in sheep and goats. In: *Current Therapy. Theriogenology*. Ed. Morrow DA, Saunders WB. pp 89-95.
- Moore NW, Eppleston J. 1979. Embryo transfer in the Angora goat. *Aust. J. Agric. Res.* 30: 973-981.
- Moore NW, Rowson LEA. 1960. Egg transfer in sheep factors affecting the survival and development of transferred eggs. *J. Reprod. Fert.* 1: 332 (Abstr.).
- Mueller J. 1993. Utilización de la inseminación artificial y la superovulación con transferencia de embriones en el mejoramiento genético de ovinos. *Comunicación Técnica del INTA CD Producción Animal*. 323: 1-8.
- Remy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumande J, Chupin D, Beckers JF. 1991. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone? *Theriogenology* 36: 389-399.
- Renard JP, Heyman Y, Ozil JP. 1982. Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle methode de decongelation pour le transfert cervical d'embryons conditionnes une seule fois en paillettes. *Ann. Med. Vet.* 126: 22-32.

- Ritar AJ, Bell PD, O'May PJ, Black TM, Jackson RB, Murray N. 1988. Superovulation response and embryo recovery from Cashmere and Angora does after treatment with FSH (Folltropin). 20th Ann. Conf. of Aust. Soc. Reprod. Biol., Newcastle Univ., 29-31 August (abstr.).
- Rowson LEA, Moor RM. 1966. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. *J. Reprod. Fert.* 11: 207-212.
- Shelton JN. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demiembryos. *Theriogenology* 37: 507-514.
- Stringfellow DA, Riddell KP, Zurovac O. 1991. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. *New Zealand Vet. J.* 8-17.
- Tervit HR, Goold PG, Mc Kenzie RD, Clarkson DT, Drummonds J. 1984. Embryo transfer in Angora and Saanen goats. *New Zealand Vet. J.* 33: 77-80.
- Tervit HR, Goold PG, Mc Kenzie RD, Clarkson DT. 1983. Techniques and success of embryo transfer in Angora goats. *New Zealand Vet. J.* 31: 67-70.
- Tervit HR, Goold PG. 1984. Deep freezing sheep embryos. *Theriogenology* 21: 268 (abstr.).
- Tervit HR, Havick PG. 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zealand Vet. J.* 24: 138 (abstr.).
- Tervit HR. 1986. Embryo transfer and artificial insemination in Angora goat. *Sem. Mohair Conf. New Zealand*, 12-17.
- Torres S, Cognie Y, Colas G. 1984. Transfert des embryons chez les ovins. IX Journées de la Recherche Ovine et Caprine, Ed. INRA-ITOVIC-SPEOC, Paris. pp 215-239.
- Torres S, Sevellec C. 1987. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 27: 859-863.
- Torres S, Cognie Y, Colas G. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology* 27: 407-418.
- Traldi A, Silva ROC, Catto DR, Pugliesi D, Pereyra Bonnet F, Gibbons A. 2009. Goat embryos survival vitrified in micropipette tips compared to fresh embryos. *Annais del XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. MG: Brasil (CD-ROM). ISSN1984-871. p. 404.*
- Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P. 1999. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 51: 175.
- Trounson AQO, Moore NW. 1974. Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination. *Aust. J. Biol. Sci.* 27: 301-304.
- Tsunoda Y, Sugie T. 1989. Superovulation in non-seasonal Japanese native goats, with special reference to the developmental progression of embryos. *Theriogenology* 31: 991-996.
- Vallet JC, Baril G, Rougier F, Chupin D, Procureur R, Corteel JM. 1987. Feasibility and repeatability of embryo recoveries from dairy goats under laparoscopy. 3rd Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 60 (abstr.).
- Vallet JC, Baril G. 1990. Effect of time of laparoscopic intrauterine insemination in superovulated dairy goats. 6th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 188 (abstr.).

- Vallet JC, Casamitjana P, Brebion P, Perrin J. 1991. Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. Recueil de Médecine Veterinaire, Special Reprod. des ruminants 1: 293-230.
- Walker SK, Smith DH, Frenshman A, Ashman RJ, Seamark RF. 1989. The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. Theriogenology 31: 741-752.
- Walker SK, Smith DH, Seamark RF. 1986. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. J. Reprod. Fert. 77: 135-142.
- Warwick BL, Berry RO, Horlachwer WR. 1934. Results of mating rams to Angora females goats. Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 225 (abstr.).
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . Science 178: 411-414.
- Wilmut Y, Rowson L. 1973. Experiments on the low temperature preservations of cow embryos. Vet. Rec. 92: 686-690.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM. 1976. Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fert. 46: 151-154.
- Winterberger-Torres S, Sevellec C. 1987. Atlas du developement embryonnaire precoce chez les ovins. INRA Station de Physiologie Animale. Jouy en Josas. Publ. Versailles. pp 51.
- Wolff M, Gibbons A, Cueto M, Willems P, Arrigo J. 1994. Results of artificial insemination with frozen semen in Australian Merino ewes multiovulated with FSHp. IV World Merino Conference. Montevideo, Uruguay. pp 269 (abstr.).

ANEXOS

Anexo 1. Grados de clasificación de embriones

Grado I: Excelente, embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme. El desarrollo embrionario corresponde al día de la recolección. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles y la zona pelúcida está intacta.

Grado II: Bueno, hay algunas imperfecciones triviales, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas. Su forma puede ser ligeramente irregular.

Grado III: Regular, el embrión posee defectos definidos: detritus celulares, forma irregular, color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida. Pocas células degeneradas, vesículas y presencia de blastómeros desprendidos.

Grado IV: Malo, el embrión posee severos defectos: los correspondientes al grado III más desarrollo retardado, sería ruptura de la zona pelúcida -el embrión puede estar parcialmente fuera de la misma-, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros. Incluye a los estados hasta 8 células y la degeneración. Esta categoría de embriones no es transferible.

Anexo 2. Medios de congelamiento

Para preparar una solución 1 M de etilenglicol se colocan 5.59 ml para 100 cc de medio de conservación. Por simple cálculo se obtienen las concentraciones de etilenglicol para las concentraciones 0.5 M y 1.5 M.

Para la solución de sucrosa 0.25 M se agregan 8.56 g de sucrosa a 100 cc de medio de conservación.

Anexo 3. Técnica de vitrificación

(Gibbons y col, 2008; 2009)

Soluciones de Vitrificación

SOLUCION 1

4.5 ml Solución A* + 0.5 ml Glicerol (10%)

5 min a 25 °C

SOLUCION 2

3.5 ml Solución A + 0.5 ml de Glicerol (10%) + 1 ml de EG (20%)

5 min a 25 °C

SOLUCION 3

2.5 ml Solución A + 1.25 ml de Glicerol (25%) + 1.25 ml de EG (25%)

30 segundos a 25 °C

Soluciones de Desvitrificación

SOLUCION 1

3.75 ml Solución A + 0.625 ml de Glicerol (12,5%) + 0.625 ml de EG (12,5%) + 0.86 g de Sucrosa (0,5 M)**

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 2

5 ml Solución A + 0.86 g de Sucrosa (0.50 M)

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 3

5 ml Solución A + 0.43 g de Sucrosa (0.25 M)

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 4

5 ml Solución A

2.5 minutos a 25 °C

SOLUCION 5

5 ml Solución A

2.5 minutos a 25 °C

***Solución A: 28 cc de PBS + 7 cc suero**

****PM Sucrosa: 342.296 g (1.71148 g en 5 ml de Solución)**



Foto 1. Ovarios con ovulaciones múltiples post tratamiento con 80 mg de FSH y 200 UI de eCG.

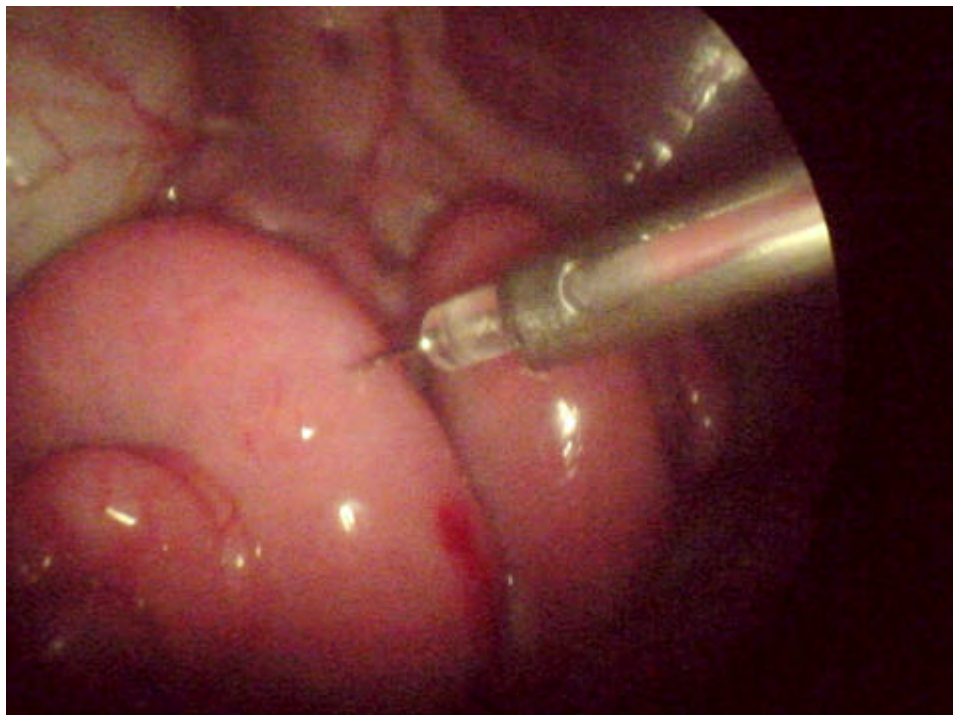
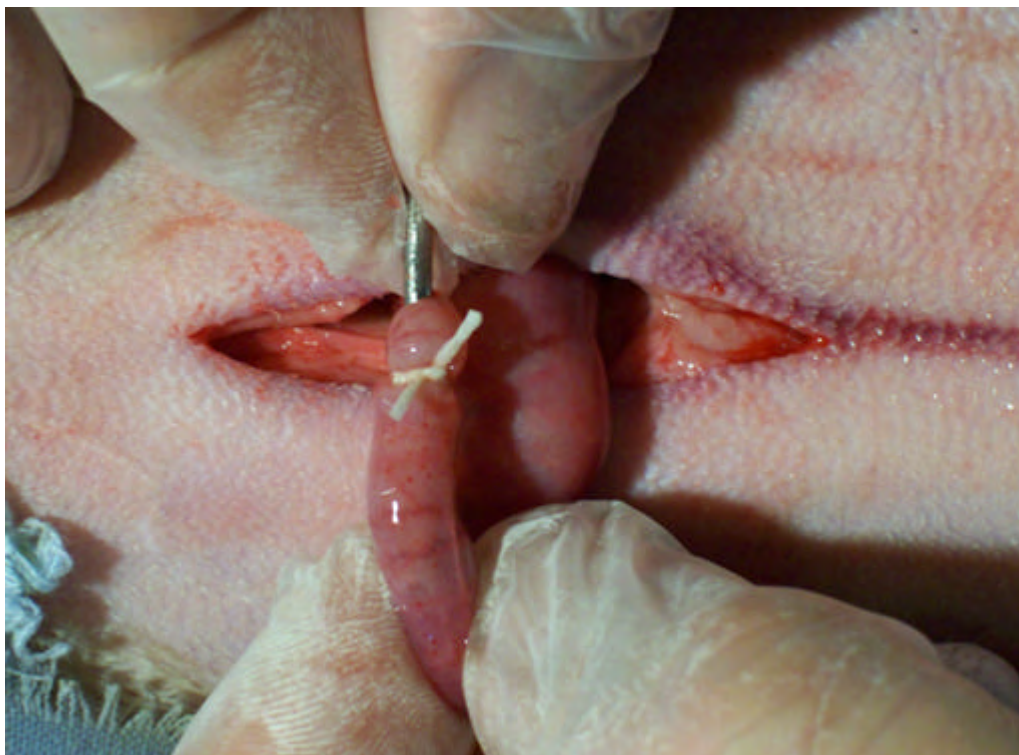
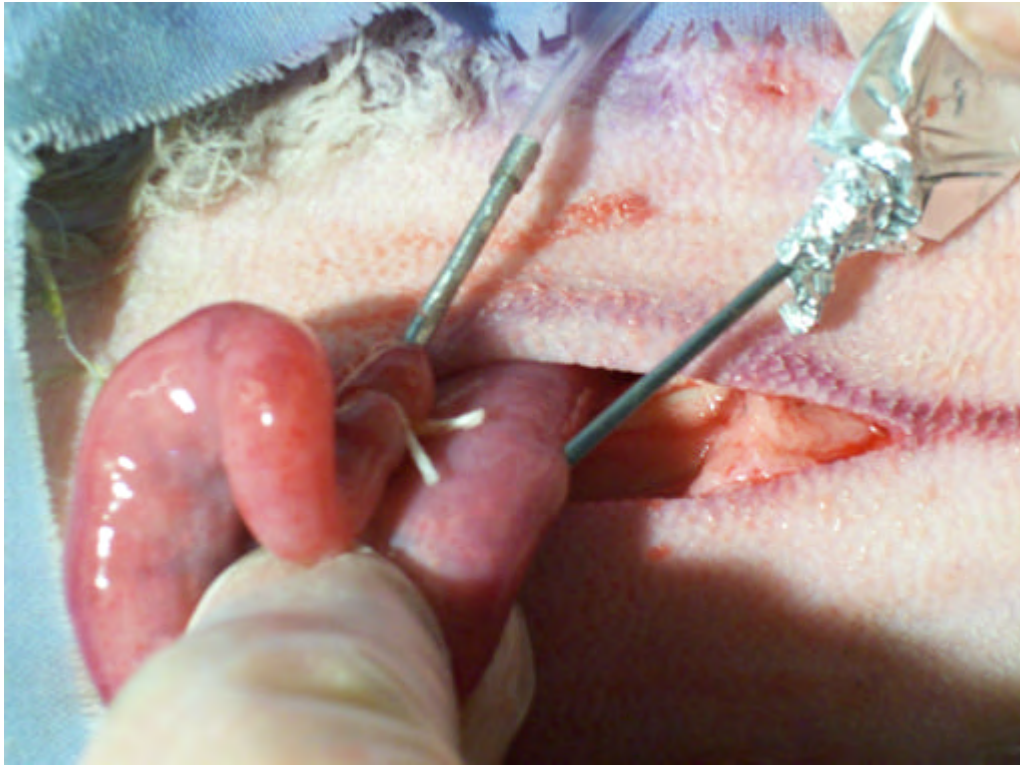


Foto 2. Inseminación artificial intrauterina con semen congelado por laparoscopia en oveja donante.



Fotos 3 y 4. Punción y fijación de la sonda al cuerno uterino (unión útero tubárica) para la colecta quirúrgica de embriones.



Fotos 5 y 6. Punción del cuerno uterino (Tercio distal) y recuperación embrionaria mediante corriente de arrastre.



Foto 7. Recuperación embrionaria mediante corriente de arrastre en Erlenmeyer de colecta.

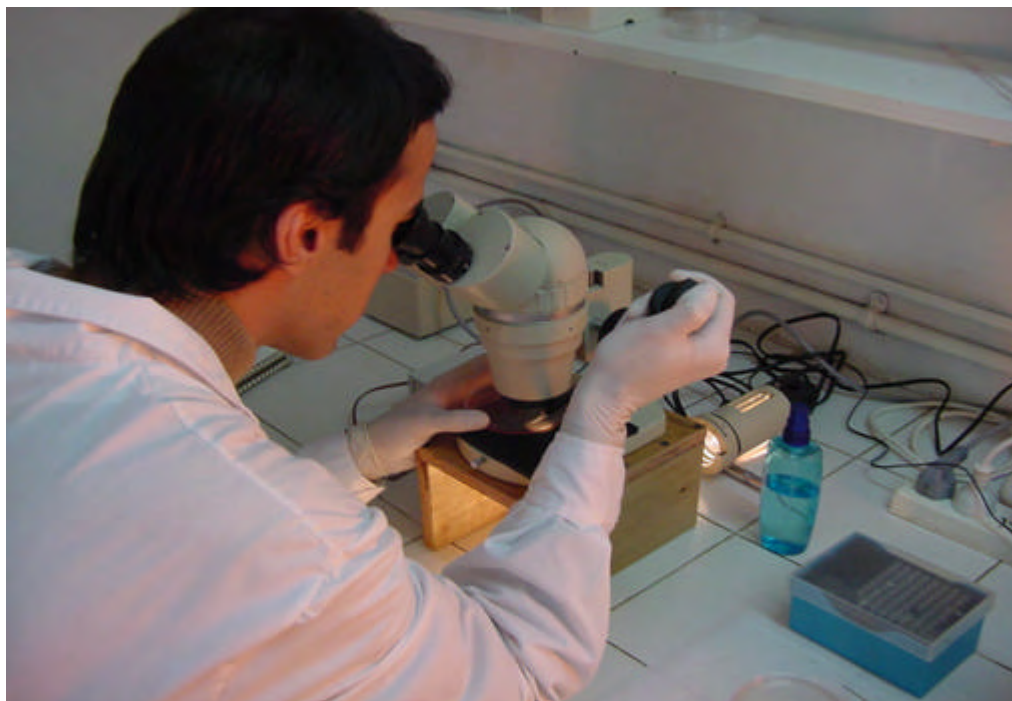


Foto 8. Búsqueda y clasificación de embriones bajo lupa.



Foto 9. Punción del cuerno uterino (Tercio proximal) para la siembra semi-quirúrgica de embriones.

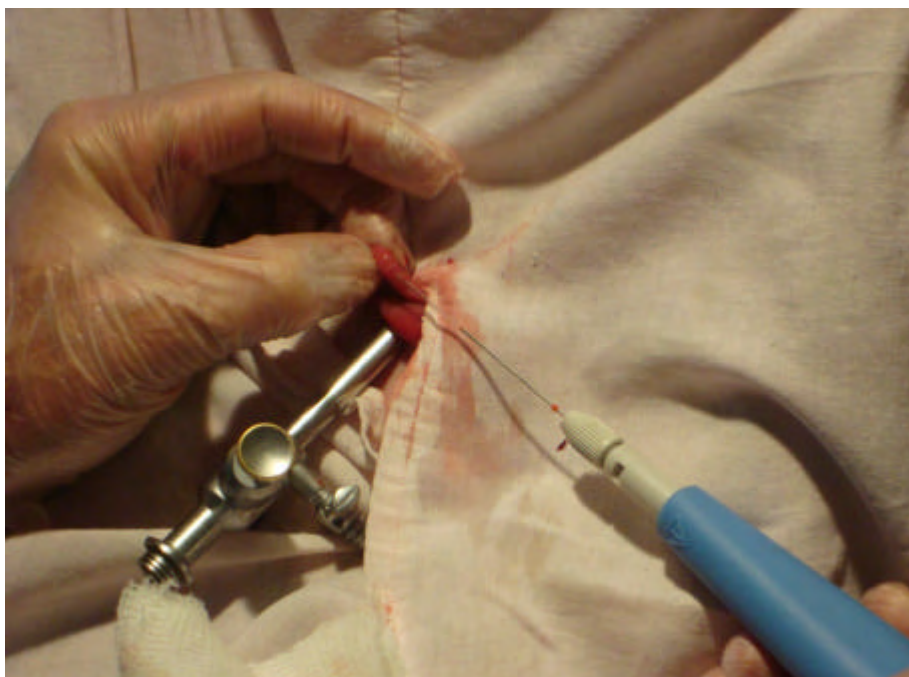


Foto 10. Siembra semi-quirúrgica de embriones con exteriorización del cuerno uterino por pinzamiento.