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

**TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
EN OVINOS Y CAPRINOS**

Dr. A.E. Gibbons e Ing. Agr. M.I. Cueto

INTA EEA Bariloche
Centro Regional Patagonia Norte

-1995-

INDICE

Introducción.....	3
Garantía sanitaria de la transferencia de embriones.....	5
Principios y consideraciones generales sobre la transferencia de embriones.....	5
-Fisiología hormonal y sincronización del estro	
-Estimulación ovárica para la ovulación múltiple	
-Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple	
-Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donante y receptora	
-Fecundación en la hembra donante	
-Colecta de embriones	
-Búsqueda de embriones	
-Clasificación de embriones	
-Siembra de embriones	
-Conservación de embriones	
Técnica de congelamiento.....	21
Técnica de descongelamiento.....	22
Eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones.....	24
Partición de embriones.....	25
Conclusiones generales.....	25
Anexos.....	27
-Grados de clasificación de embriones	
-Preparación del medio de colecta de embriones (PBS)	
-Medios de congelamiento	
Bibliografía.....	28

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es un método de reproducción artificial que consiste en la obtención de varios embriones generados por una hembra donante, y que serán posteriormente inoculados en hembras receptoras (gestantes). Una reproductora donante, podrá formar parte de un programa de transferencia en más de una oportunidad, de manera de multiplicar su potencial reproductivo, utilizando los vientres de la misma especie pero de escaso valor genético.

Los primeros trasplantes 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 la TE.

Esta técnica ha sido empleada durante los últimos 10 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), y recientemente se ha comenzado con la exportación de embriones congelados de cabras lecheras de las razas Alpina y Saanen.

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 obtienen entre 6 a 8 crías. El potencial natural reproductivo de cada especie y de cada raza, es una limitante a la rapidez de difusión del progreso genético.

El objetivo de la TE es incrementar el número de crías de las hembras de alto valor genético. Esta técnica, permite lograr un mayor aprovechamiento de la gran cantidad de ovocitos que existen en el ovario de una hembra. Consiste en realizar una estimulación de los ovarios mediante tratamientos hormonales, para que se produzca una ovulación múltiple. De esta manera, los valores medios alcanzan a ser 10 veces superiores a la tasa ovulatoria promedio de la raza.

Con la TE es posible acortar el intervalo generacional, y en consecuencia incrementar el avance genético. A su vez, la inseminación artificial y la TE son excelentes herramientas para el mejoramiento genético de majadas y hatos aislados de los proveedores de reproductores mejoradores.

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:

- Aumentar el progreso genético en la producción, a través del incremento de la intensidad de selección de las madres destinadas a la producción de machos superiores, al disponer de un mayor número de crías por hembra. Por consiguiente se puede incrementar la ganancia genética al poder realizar una mayor presión de selección.

- Aumentar la eficiencia de los programas de núcleos de producción de leche, carne o lana, ya que es posible realizar una estimación del valor genético de las hembras, evaluando la producción de las hermanas, y medio hermanas. A su vez se puede evaluar información complementaria o de alguna característica de producción en particular (Ej. valores de grasa o proteína de la leche).

- Introducir y difundir rápidamente nuevas razas o genotipos de alto valor productivo. Se reducen los altos costos de producción que se presentan con animales de baja eficiencia productiva. Las características deseables y de alta heredabilidad pueden ser rápidamente multiplicadas. 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.

- Incrementar la tasa de mellizos (gemelos idénticos). Al realizar la partición de embriones se logran individuos genéticamente iguales, siendo entonces posible probar la adaptación de los genotipos idénticos, en situaciones ambientales o de manejo diferentes.

- Acortar el intervalo generacional. La posibilidad de incrementar rápidamente la descendencia de las borregas permite una reducción del intervalo generacional, con mayor beneficio cuando se emplea semen de animales jóvenes de testaje.

- Apoyar las técnicas reproductivas en las que interviene la micromanipulación de embriones (determinación del sexo, fecundación in vitro, etc.).

- Conservar razas o especies. La conservación de material genético (embriones congelados) permite el reaseguro en bancos de genes que de otra manera desaparecerían con la especie.

- Difundir material genético de alto valor comercial con facilidad de adaptación ambiental de las crías a diferentes sistemas de producción y manejo.

- 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.

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.

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).

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.

Las hembras deben al menos haber tenido una cría, y se debe considerar un mínimo de 2 meses (ovinos) a 5 meses (caprinos) post-parto antes de comenzar los tratamientos hormonales. Acortar estos tiempos puede significar una pobre fertilidad.

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 60% 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 un buen amamantamiento.

No se deben descuidar los aspectos sanitarios, realizando el control clínico de los animales, los tests serológicos de enfermedades infecto contagiosas (Brucelosis, Aftosa, etc.) y los controles parasitarios correspondientes.

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.

Una vez realizado el tratamiento hormonal de ovulación múltiple, se lleva a cabo la fecundación de los ovocitos. Se puede emplear el servicio natural o inseminación artificial con semen fresco o congelado. Los machos a utilizar también deben ser de muy alto valor genético. Lo ideal es usar machos seleccionados y testeados a través de su descendencia, para el mejoramiento de alguna característica específica de producción.

A partir del 5to al 7mo día de detectado el celo, los embriones se obtienen por vía quirúrgica o bajo control endoscópico. Los mismos pueden ser transferidos a las hembras receptoras, en forma inmediata, o bien ser congelados (crioconservación), para su transporte y posterior transferencia.

Se deben considerar los siguientes ítems antes de iniciar un programa de TE:

- 1- Fisiología hormonal y sincronización del estro.**
- 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 y sincronización del estro

Los tratamientos hormonales específicos en hembras donantes y receptoras, 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* o *gonadoliberina* es un decapeptido producido por neuronas secretoras del sistema nervioso central. La secreción de esta hormona está influenciada por condiciones externas (fotoperíodo, feromonas, stress, nutrición) e internas (estrógeno, progesterona). 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). Esta hormona ha sido utilizada para lograr la concentración de la ovulación.

Las gonadotrofinas, FSH y LH, son glicoproteínas sintetizadas a nivel de la hipófisis anterior, y participan en la regulación 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. Su secreción es continua, y presenta dos picos: uno conjuntamente a la descarga preovulatoria de LH, y otro, de menor intensidad, 2 a 3 días más tarde.

La *LH* incrementa su concentración, durante un corto período, en forma de pulsos que decrecen progresivamente hasta su nivel basal. 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, produce 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 del ovario, y en el caso de ocurrir fertilización, por la placenta. Su función es mantener la gestación. 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 posibilidad de una ovulación.

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. Su duración es de 14 días en el ovino, y de 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 *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.

La gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG) o gonadotrofina coriónica equina (eCG) posee actividad FSH, y en menor medida, actividad LH. Se utiliza al final de los tratamientos con esponjas intravaginales con progestágenos en el método de sincronización de celos; y en altas concentraciones, en los tratamientos hormonales para la ovulación múltiple en ovejas y cabras.

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 progestativo. Los tratamientos con *PMSG* dan 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 y luteinización folicular prematura, y reduce la fertilidad con disminución de la calidad y la recuperación embrionaria (Armstrong y Evans, 1983; Armstrong y col, 1983; Moor y col, 1985; Tsunoda y Sugie, 1989; Walker y col, 1989). El tiempo de ovulación 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). Scudamore y col. (1993) realizaron tratamientos con *FSH*, utilizando tratamientos progestacionales con *CIDR*, *FGA*, Prostaglandina (*PF2* alfa) y *FGA* + Progesterona. Este último tratamiento determinó un incremento significativo de la tasa ovulatoria y en el número de embriones transferibles, no recomendando la utilización de la *PF2* alfa.

En contraste con la *PMSG*, el empleo de la *FSH* determinó una mejor migración espermática (Evans y Armstrong, 1984), mayor tasa de fertilización cuando se emplea la inseminación artificial (Evans y col, 1984) y mayor producción de embriones (Armstrong y col, 1983; Torres y col, 1987).

Las dosis de *FSH* se expresan en miligramos Armour, que es una unidad de actividad de un test biológico equivalente a 10 a 14 μ g 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, 1991a; Brebion y col, 1992); la respuesta ovulatoria a estas dosis está sujeta a los diferentes genotipos. El incremento de la dosis de *FSH* (mayor a 16-20 mg Armour) no produce un incremento de la respuesta ovulatoria.

El tratamiento más aceptado para provocar la ovulación múltiple en ovinos es la aplicación de 16 mg totales de FSH. La administración se realiza en dosis decrecientes (5, 4, 3, 2 mg) cada 12 horas, a partir del día 12 de colocada la esponja intravaginal con progestágeno. Las esponjas se retiran en la 4ta aplicación de FSH.

Para obtener una mejor respuesta ovulatoria se aconseja administrar LH en forma creciente (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).

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 5-6 aplicaciones cada 12 horas. La ovulación se presenta a las 60 horas PREIP (Walker y col, 1986).

La presentación del celo post tratamiento de FSH es variable; es habitual observar celo entre las 16 a 48 horas PREIP.

El tratamiento para las cabras con FSH 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).

En las cabras de raza Cashmere, dosis de 6 a 9 mg son suficientes para inducir la ovulación múltiple, no así para las cabras de raza Angora (Ritar y col, 1988). Por lo tanto, se debe ajustar la dosis según la raza con que se pretenda trabajar.

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

En la cabra, los tratamientos repetidos de FSH porcina producen 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). No se presenta esta situación en tratamientos con FSH de origen ovino o caprino, pero la respuesta ovulatoria es muy variable según la partida de la hormona.

Otra forma de aplicación de la FSH es mediante el empleo de implantes subcutáneos de bombas osmóticas. Los resultados han sido de baja eficiencia con respecto a la administración inyectable (Sharpe y col, 1986).

Tanto en ovinos como en caprinos, sugerimos un tratamiento combinado de FSH en dosis decrecientes (dosis total: 12 mg, en 6 aplicaciones de 3, 3, 2, 2, 1, 1 mg, distanciadas entre sí cada 12 horas), junto con una administración única de PMSG (400 a 800 UI), 48 horas antes de retirar las esponjas con progestágenos.

Mediante este tipo de tratamiento combinado, se ha reportado un mayor porcentaje de ovejas con respuesta multiovulatoria a la dosis única de PMSG o FSH y con una tasa elevada de embriones transferibles (87%) (Ryan y col, 1991). En los caprinos, también ha sido empleado con buenos resultados (Batt y col, 1993).

Otra alternativa recientemente desarrollada para incrementar la eficiencia de la TE es realizar el bloqueo antigonal con análogos de la GnRH (implantes subcutáneos de una bomba osmótica). Este tratamiento se realiza con el fin de obtener una población de folículos de 1 a 2 mm, para luego estimularlos con una alta dosis de 40 mg de FSH. De esta forma, prácticamente se duplica el número de ovulaciones y de embriones transferibles, con una alta respuesta del lote tratado y con celos agrupados entre las 16 a 24 horas de finalizado el tratamiento progestacional (Brebion y col, 1992).

Se han ensayado otros tratamientos con extracto hipofisiario de equino (HAP) o gonadotrofina menopáusica humana (hMG). Los resultados en ovinos y caprinos han sido similares a los obtenidos con FSH (Moore y Eppleston, 1979; Shiewe y col, 1985; Baldassarre y col, 1992).

En resumen debemos tener presente los siguientes conceptos:

- **La ovulación múltiple debe realizarse al final de un tratamiento progestacional de sincronización de estros.**
- **La duración de la estimulación es semejante al crecimiento folicular terminal (3 días).**
- **Se recomienda el empleo de dosis decrecientes de FSH y crecientes de LH, o la combinación FSH - PMSG.**

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 no responderá al tratamiento hormonal de ovulación múltiple.

La variabilidad individual a la respuesta hormonal de ovulación múltiple está condicionada por el estado fisiológico del ovario y por el número de pequeños folículos (1 a 2 mm) en el momento de comenzar el tratamiento hormonal con FSH (Brebion y Cognie, 1989).

En la selección de las hembras donantes se debe tener presente la alta variabilidad individual en la respuesta ovulatoria múltiple. Para evitar un gasto innecesario de tiempo y dinero, es posible realizar una predeterminación de la respuesta ovulatoria. La respuesta individual de cada hembra donante está correlacionada positivamente ($r = +0.7$) con el número de folículos presente al momento de iniciar el tratamiento hormonal de ovulación múltiple (Gibbons y Cueto, sin publicar). La factibilidad de realizar una predeterminación individual por observación laparoscópica permite rechazar las hembras que darán un bajo número de embriones.

La raza es otro 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 con 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).

La alimentación juega un rol muy importante 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). En cabras, la aparición de este fenómeno es muy variable (0% a 27%). Consecuentemente la recuperación

embrionaria es baja, debido al transporte anormal de los embriones en el medio uterino (Armstrong y col, 1982; Tervit, 1986). Este problema también ha sido reportado en ovinos (Trounson y Moore, 1974; Jabbour y col, 1991).

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 la TE.

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

La sincronización del estro de las receptoras mediante tratamiento progestacional (esponjas intravaginales, MAP o FGA), se realiza en forma conjunta con el lote de hembras donantes. El objetivo es disponer de un similar estado fisiológico sexual entre donante y receptora, al momento de realizar la TE.

En las cabras se recomienda la aplicación de PMSG, 48 horas antes del retiro de las esponjas. La dosis de PMSG varía según la raza y el estado fisiológico reproductivo (valores indicativos: 200 a 500 UI). Debido a que en las hembras donantes el celo se presenta anticipado respecto a las hembras receptoras, en estas últimas se deben retirar los pesarios 12 horas antes.

En los ovinos, la PMSG (valores indicativos: 200 a 400 UI) se aplica al momento de retirar las esponjas, y el retiro se adelanta 12 horas con respecto a las hembras donantes.

5- Fecundación en 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):

cervical: 400 a 600 (caprinos) - 800 (ovinos).

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 caprinos (Vallet y Baril, 1990) y ovinos (Wolff y col, 1994), 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 es conveniente realizarla entre las 40 a 44 horas PREIP (Evans y col, 1986). Wolff y col. (1994) han obtenido una tasa de fertilidad del 70-80% al realizar la IA indistintamente a las 42 o 55 horas PREIP.

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, se aconseja realizar la IA a las 46 horas PREIP (Fieni y col, 1990).

- Tasa de fertilización

En ovinos, mediante IA con semen fresco, se han obtenido tasas de fertilización del 77% y 93% en la IA cervical y laparoscópica, respectivamente (Brebion y col, 1988).

La eficiencia de fertilización con el empleo de semen congelado 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% (Wolff y col, 1994).

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 (Fieni y col, 1990).

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).

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

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. El medio que se utiliza es el PBS (Solución Buffer Fosfato) (ver anexo), enriquecida con 4% de Albúmina sérica bovina (BSA fracción V) o 10% de suero fetal bovino, ovino o caprino. 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 y se somete a la acción de rayos gamma (IETS). La inactivación de la proteína complemento se realiza a 56°C durante 30 minutos. El suero filtrado inactivado se puede conservar durante un año a temperatura de -20°C.

En general, la colecta de embriones se realiza entre los días 5to a 7mo (ovejas) y 6to a 7mo (cabras), posterior al día de inicio del celo (día cero). En ovejas, nosotros realizamos la colecta de embriones en el 7mo día post-retiro de las esponjas (sin detección de celos).

La razón de estos tiempos se debe 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:

- **Técnica quirúrgica -laparotomía media.**
- **Técnica no quirúrgica -laparoscopia.**
- **-transcervical.**

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 (0.4 cc IM, Xilazina al 2%) y un anestésico (7 mg/kg de peso vivo EV, Thiopental sódico). Para un tiempo prolongado de intervención, se utiliza una anestesia inhalatoria a base de halotano y oxígeno. También es posible realizar una combinación de Xilazina (0,11 mg/kg) y Clorhidrato de ketamina (5.5 mg/kg), suministrando esta última a los 10 minutos de la primera.

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 la exteriorización de los ovarios, para determinar la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos). La intervención consiste en la colocación de una sonda (K33) que en su extremo dispone de una aguja (50/20) con punta no traumática y con 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. 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 37°C. De esta manera se produce una corriente de arrastre que fluye hacia el oviducto y que sale por la sonda hasta un Erlenmeyer de colecta previamente entibiado. Finalizada la recuperación embrionaria, se realiza la sutura de los planos quirúrgicos y se administran antibióticos. Se procede de igual manera con el otro cuerno uterino.

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).

Esta técnica permite una recuperación del 70% de los embriones. El inconveniente que presenta es la formación de adherencias post quirúrgicas que reducen la eficiencia de posteriores recuperaciones embrionarias. Torres y Sevellec (1987) obtuvieron eficiencias del 88%, 52% y 24% para la 1er, 2da y 3er 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 no crea adherencias y por lo tanto no se disminuye el porcentaje de recuperación embrionaria en intervenciones sucesivas. Mc Kelvey y col. (1986) obtuvieron tasas de recuperación de 35%, 76% y 66% en ovinos, y Vallet y col. (1987) 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.

La recuperación embrionaria transcervical no ha alcanzado amplio desarrollo, debido a que es una técnica cuya eficiencia es muy variable. Flores-Foxworth y col. (1992) lograron una recuperación embrionaria del 36%, mientras que Soonen y col. (1991) obtuvieron una recuperación del 37% y 53% en ovejas y cabras, respectivamente.

Independientemente de la técnica de recuperación embrionaria utilizada, y si se desea contar con la seguridad de que las hembras donantes no han quedado preñadas, se recomienda la administración de prostaglandinas PF2 alfa al final de las intervenciones.

7- Búsqueda de embriones

El PBS recolectado es vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realiza bajo lupa y con sumo cuidado. Se recomienda efectuar siempre una segunda lectura de la placa. A medida que se identifican los embriones, los mismos son aspirados mediante micropipetas y colocados en una caja de Petri con PBS enriquecido, con suero al 10% o BSA al 4%; 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. 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 48 horas de retraso. En el día 6to o 7mo, se deben descartar los embriones de menos de 32 células. Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración.

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 el porcentaje de preñez cuando se transfieren embriones de calidad media o mediocre respecto a la calidad buena o excelente (ver anexo). Esta diferencia es mayor cuando se procede a la siembra de embriones que fueron congelados en nitrógeno líquido.

Se sugiere consultar el Atlas de Winterberger-Torres y Sevellec (1987), sobre morfología y calidad embrionaria.

9- Siembra de embriones

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la recuperación de los embriones y su siembra, no supere las 2 horas.

Si se trata de embriones previamente congelados, el tiempo 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, 1991a). 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 identifica el cuerno uterino por laparoscopia, se realiza una pequeña incisión de 3 cm en la línea media abdominal, y mediante una pinza, se exterioriza el cuerno uterino para realizar la siembra embrionaria.

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 (0% a 78%) que se puede presentar en la tasa de sobrevivencia de embriones para una igual calidad embrionaria entre distintas madres (Heyman y col, 1987).

Es importante realizar un examen laparoscópico 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 la tasa de ovulación. Armstrong y col. (1983) obtuvieron valores del 52%, 63% y 75% de sobrevivencia embrionaria con recipientes con 1, 2 y 3 cuerpos lúteos.

En ciertas oportunidades y en especial cuando se trata de cabras, se presentan receptoras con folículos quísticos o cuerpos lúteos anormales. 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 los tiempos entre la recuperación, búsqueda y clasificación, y la siembra de embriones. Debido al trabajo que implica la realización de un programa de TE, debe estar muy bien programado y coordinado para evitar pérdidas de tiempo y labores innecesarias. La técnica de laparoscopia facilita la realización de una buena clasificación previa de las donantes por su respuesta ovulatoria, y la determinación de la respuesta ovulatoria de las receptoras.

10- Conservación de embriones

10a- Conservación por enfriamiento a 4°C

La posibilidad de conservación de embriones permite la difusión de material de alto valor genético. Para un transporte a corta distancia, la refrigeración a 4°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, o en forma directa.

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

Los primeros trabajos de conservación de embriones a bajas temperaturas fueron realizados a mediados del presente siglo por Chang. En animales domésticos, los primeros resultados se publican en la década del 70 (Whittingham y col, 1972; Wilmut y Rowson, 1973). Las técnicas de congelamiento para las especies de referencia se basaron en los trabajos realizados por Whittingham y col. (1972). 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 cambios osmóticos y a la incorporación de medios crioprotectores. Estos compuestos (polialcoholes) son capaces de penetrar en las células por difusión simple y su función es retardar 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, por difusión, hacia el exterior, 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 dimetilsulfósido (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% y 55% (Tervit y Goold, 1984; Hunton y col, 1985; Le Gal y col, 1993).

La congelación se lleva a cabo con embriones de calidad excelente o muy buena, en estado de mórula compacta o blastocisto expandido (día 6to o 7mo). El estadio de blastocisto es más resistente al congelamiento, debido a que una parte de las células puede ser destruída sin que se limite su futuro desarrollo. Las experiencias en microcirugía han mostrado que se puede suprimir hasta la mitad de las células (mitad del botón embrionario y trofoblasto) y aún así obtener una cría. Cuando se congelan blastocistos, una parte de las células puede sufrir severos daños sin que se afecte la viabilidad del embrión post descongelamiento.

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 para este caso son de tipo sanitario.

Técnica de congelamiento

Una vez recuperados los embriones, éstos se seleccionan y colocan durante 10 minutos en soluciones crecientes de etilenglicol (0.5 M, 1 M, 1.5 M) (ver anexo) en PBS a 20-25°C. Finalizada esta etapa, se colocan en pajuelas de 0.25 cc (pajuelas para semen). Es importante rotular las pajuelas, indicando la hembra donante, la raza, el número de embriones y la fecha. Los embriones van acondicionados con PBS en la pajuela, separados a ambos extremos por un espacio de aire y una columna de PBS. A continuación, se sella la pajuela con alcohol polivinílico.

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 y congelamiento no debe superar los 40 minutos.

El descenso de temperatura se realiza a razón de 1°C 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). 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.

El seeding se realiza mediante dos contactos de 2 a 3 segundos cada uno (sobre el borde de la fracción de aire situada por encima de la fracción que contiene los embriones), por medio de una pinza enfriada en nitrógeno líquido.

Otra técnica de congelamiento es la *vitrificación*. El principio físico se basa en someter a los embriones a una alta concentración de crioprotector de manera de evitar la formación de cristales de hielo. Los embriones se colocan a 20°C durante 10 minutos en una solución de glicerol (10%) y propilenglicol (20%) en PBS, o PBS + BSA al 6%. En un segundo paso, se sumergen en una solución de glicerol 25% + propilenglicol 25% durante un minuto. Finalmente se congelan en forma directa en nitrógeno líquido. En esta técnica, la descongelación de la pajuela se realiza en agua a 20°C y se colocan en una solución de sucrosa 1 M en PBS durante 10 minutos y dos baños de PBS durante 10 minutos (Szell y col, 1990). Esta técnica no ha sido muy desarrollada y los resultados son inferiores a los mencionados anteriormente. El valor de referencia de sobrevivencia embrionaria post descongelamiento varía entre el 12% y el 22% (Szell y col, 1990; de Paz y col, 1994).

Técnica de descongelamiento

El descongelamiento de los embriones se realiza en 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 con concentraciones decrecientes de etilenglicol (1 M, 0.5 M), y luego se los pasa a una placa con PBS. 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 crea, por lo tanto, un medio hiperosmótico extracelular que ejerce una función de difusión masiva del crioprotector hacia el exterior de los embriones. En la práctica, los embriones descongelados se colocan en una solución de PBS con 0.25-0.5 M de sucrosa durante 5 a 10 minutos, y luego se realizan 3 pasajes sucesivos de 5 a 10 minutos en PBS.

Renard y col. (1982) presentaron la posibilidad de introducir dos cámaras de sucrosa 0.25 M en PBS en ambos extremos de la pajueta, 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 pajueta, se agita para que se produzca la unión de las cámaras y los embriones. Los embriones no se observan a la lupa, sino que todo el contenido de la pajueta 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).

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 de los embriones, acondicionados en pajuelas, en una cámara central de PBS con suero al 10% + etilenglicol 1.5 M, 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, y en número de 2, 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%.

Eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones

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

- Número de cuerpos lúteos por hembra donante: caprino, 14-15; ovino, 11.
- Número de embriones + óvulos recuperados por vía quirúrgica: 70 a 80% en ambas especies.
- Tasa de fertilización por IA laparoscópica: caprino, 75%; ovino, 80%.
- 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:
 - Cabras: 70.5% (quirúrgico).
75.6% (laparoscópico) (Vallet y Baril, 1990).
 - Ovinos: 69% (quirúrgico).
74% (laparoscópico) (Brebion y Cognie, 1989).
- 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 tratamientos mediante el uso de agonistas de GnRH, FSH y hCG, se ha reportado una duplicación en el número de cuerpos lúteos (Brebion y col, 1992).

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

Número promedio de CL: Ovinos: 10(a) - 19(b).
Caprinos: 8.6(a).

Recuperación quirúrgica: Ovinos-caprinos: 60-70%.

Tasa de preñez mediante TE por técnica quirúrgica inmediata: Ovinos: 57%.
Caprinos: 60%.

(a) Tratamiento con 16 mg de FSH (González y col, 1991b).

(b) Tratamiento combinado 400 UI PMSG y 12 mg FSH (Gibbons y Cueto, sin publicar).

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 TE partidos y congelados es baja (5.6%) (Shelton, 1992).

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. Actualmente las técnicas modernas de reproducción animal están orientadas al incremento de la eficiencia en el número de crías por hembra donante, y consecuentemente, a la reducción de los costos operativos. Este valor puede incrementarse al mejorar la respuesta ovulatoria (FSH + PMSG), así como predeterminando las hembras que responderán al tratamiento hormonal, mediante observación laparoscópica.

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.

ANEXOS

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.

Preparación del medio de colecta de embriones (PBS)

Solución 1: mg/litro

Cloruro de calcio	132.5
Cloruro de magnesio	100.0

Solución 2: mg/litro

Cloruro de sodio	8000
Cloruro de potasio	200
Fosfato monopotásico	200
Fosfato disódico	1150
D-Glucosa	1000
Piruvato de sodio	360
Sulfato de estreptomicina	500
Penicilina G	100.000 UI

Se prepara la solución 1 en 200 cc y la 2 en 800 cc de agua bidestilada y estéril. El pH se ajusta a 7.3. Se debe esterilizar la solución final por filtrado a 0.22 u y conservar a 4°C.

El PBS enriquecido contiene BSA al 4% o suero fetal bovino, caprino u ovino al 10%, inactivado y filtrado.

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.

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, D.T., Miller, B.G., Walton, E.A., Pfitzner, A.P., Warnes, G.M. 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, A.O. and Moore, N.W. Aust. Soc. Reprod. Biol., Sydney.
- Armstrong, D.T., Evans, G. 1983. **Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats.** Theriogenology 19: 31-42.
- Armstrong, D.T., Pfitzner, A.P., Warnes, G.M., Seamark, R.F. 1983. **Superovulation treatment and embryo transfer in Angora goats.** J. Reprod. Fert. 67: 403-410.
- Armstrong, D.T., Evans, G. 1984. **Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes.** J. Reprod. Fert. 71: 89-94.
- Baldassarre, H., Aste, F., Argerich, M.C., Mateo, D.G. 1992. **Comparative study between human menopausal gonadotrophin (HMG) and hipofisiary follicle stimulating (FSH-P) for superovulation in sheep.** 12th Intern. Cong. on Anim. Reprod., The Hague, The Netherlands, 1: 182-183 (abstr.).
- Baril, G., Casamitjana, P., Perrin, J., Vallet, J.C. 1989. **Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats.** Zuchthyg. 24: 101-115.
- Baril, G., Vallet, J.C. 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, J.C. 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.

- Baril, G., Remmy, B., Lebouef, B., Vallet, J.C., Beckers, J.F., 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.).
- Batt, P.A., Killeen, D., Cameron, W.N. 1993. **Use of single or multiple injections of FSH in embryo collection programmes in goats.** *Reprod. Fert. Dev.* 5: 49-56.
- Bilton, R. J., Moore, N.W. 1976. **In Vitro culture, storage and transfer of goats embryos.** *Aust. J. Biol. Sci.* 29: 125-129.
- Brebion, P., Lajous, D., Poulin, N., Procurer, R., Vallet, J.C. 1988. **Intrauterine insemination increased fertilization rate and embryo quality in superovulated Lacaune ewes.** 4th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 95 (Abstr.).
- Brebion, P., Cognie, Y. 1989. **Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH agonist pre-treatment.** 5th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 106 (abstr.).
- Brebion, P., Baril, G., Cognie, Y., Vallet, J.M. 1992. **Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins.** *Ann. Zootech.* 41: 331-339.
- 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.).
- Corteel, J.M., 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, P.C., 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 Paz, P., Sánchez, A.J., Fernández, Carbajo, M., Dominguez, C.A., Chamorro, C.A., 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, M.A., 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, D.T. 1984. **Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments.** *J. Reprod. Fert.* 70: 47-53.
- Evans, G., Holland, M.K., Nottle, H.B., Sharpe, P.H., Armstrong, D.T. 1984. **Production of embryos in sheep using FSH preparations and laparoscopic intrauterine insemination.** In *Reproduction in sheep*. Eds. Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. Aust. Acad. Sci. and Aust. Wool Corp., Canberra. pp 313-315.

- Evans, G., Jabbour, H.N., Moore, N.W. 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, J.F., Bach-Lijour, B., Bruvas, J.F., Daubie, M. 1990. **L'insemination artificielle intra-uterine, transperitoneale chez la chevre.** Recuell de Medicine Veterinaire 166: 479-484.
- Fieni, F. 1991. **Etude de la transplantation embryonnaire chez la chevre laitiere. Memoire de Recherche. Agregation de pathologie de la reproduction.** Ecole Veterinaire de Nantes, France. pp 159.
- Flores-Foxworth, G., Mc Bride, B.M., Kraemer, D.C., Nuti, L.C. 1992. **A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats.** Theriogenology 37: 213 (abstr.).
- Gatica, R., Boland, M.P., Crosby, T.F., Gordon, Y. 1984. **Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins.** Theriogenology 21: 555-560.
- González, R., García Vinent, J.C., Gibbons, A., Cueto, M.I. 1991a. **Laparoscopic embryo transfer in Merino Sheep in Patagonia (Argentina).** XXIV World Vet. Congress, Río de Janeiro, Brasil.
- González, R., Gibbons, A., García Vinent, J.C., Cueto, M.I. 1991b. **Embryo recovery after superovulation treatment in Merino sheep and Angora Goats in Patagonia (Argentina).** XXIV World Vet. Congress, Río de Janeiro, Brasil.
- Heyman, Y., Vincent, C., Garnier, V., Cognie, Y. 1987. **Transfer of frozen-thawed embryos in sheep.** Vet. Rec. 24: 83-85.
- Hunton, J.R., Maxwell, W.M.C., Ryan, J.P. 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, D.A. and Seidel, S.M. 2^o ed. USA, Champaign. pp 79.
- Jabbour, H.N., Ryan, J.P., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 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, J.C., 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, A.W.N., Batt, P.A., Trounson, A.O. 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.
- Mc Kelvey, W.A.C., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S. 1986. **Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy.** Theriogenology 25: 855-865.
- Moor, R.M., Osborn, J.C., Crosby, I.M. 1985. **Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation.** J. Reprod. Fert. 74: 167-172.

- Moore, N.W., Rowson, L.E.A. 1960. **Egg transfer in sheep factors affecting the survival and development of transferred eggs.** J. Reprod. Fert. 1: 332 (Abstr.).
- Moore, N.W., Eppleston, J. 1979. **Embryo transfer in the Angora goat.** Aust. J. Agric. Res. 30: 973-981.
- Remy, B., Baril, G., Vallet, J.C., Dufour, R., Chouvet, C., Saumande, J., Chupin, D., Beckers, J.F. 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, J.P., Heyman, Y., Ozil, J.P. 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, A.J., Bell, P.D., O'May, P.J., Black, T.M., Jackson, R.B., 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, 3 (abstr.).
- Rowson, L.E.A., Moor, R.M. 1966. **Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal.** J. Reprod. Fert. 11: 207-212.
- Ryan, J.P., Hunton, J.R., Maxwell, W.M.C. 1991. **Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of Pregnant Mare Serum Gonadotrophin and Follicle Stimulating Hormone.** Reprod. Fert. Dev. 3: 551-580.
- Scudamore, C.L., Robinson, J.J., Aitken, R.P., Robertson, I.S. 1993. **The effect of method of oestrous synchronisation on the response of ewes to superovulation with porcine follicle stimulating hormone.** Anim. Reprod. Sci. 34: 127-133.
- Schiewe, M.C., Howard, J.G., Stuart, L.S., Goodrowe, K.L., Wildt, D.E. 1985. **Human menopausal gonadotropin (HMG) for superovulation of sheep.** Theriogenology 23: 227 (abstr.).
- Sharpe, P.H., Mac Gregor, H.E., Armstrong, D.T. 1986. **Superovulation of ewes with constant, subcutaneous infusion of follicle stimulating hormone.** 18th Ann. Conf. of Aust. Soc. Reprod. Biol. 1: 57 (abstr.)
- Shelton, J.N. 1992. **Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demiembryos.** Theriogenology 37: 507-514.
- Soonen, A.H., Lewalski, S., Meinecke-Tillman, S., Meinecke, B. 1991. **Transcervical collection of ovine and caprine embryos.** 7th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Cambridge, 1: 208 (abstr.).
- Stringfellow, D.A., Riddell, K.P., Zurovac, O. 1991. **The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock.** New Zealand Vet. J. 8-17.
- Szell, A., Zhang, J., Hudson, R. 1990. **Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at 180° C.** Reprod. Fert. Dev. 2: 613-618.
- Tervit, H.R., Havick, P.G. 1976. **A modified technique for flushing ova from the sheep uterus.** New Zealand Vet. J. 24: 138 (abstr.).
- Tervit, H.R., Goold, P.G., Mc Kenzie, R.D., Clarkson, D.T. 1983. **Techniques and success of embryo transfer in Angora goats.** New Zealand Vet. J. 31: 67-70.
- Tervit, H.R., Goold, P.G. 1984. **Deep freezing sheep embryos.** Theriogenology 21: 268 (abstr.).

- Tervit, H.R., Goold, P.G., Mc Kenzie, R.D., Clarkson, D.T., Drummonds, J. 1984. **Embryo transfer in Angora and Saanen goats**. New Zealand Vet. J. 33: 77-80.
- Tervit, H.R. 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, 215-239.
- Torres, S., Cognie, Y., Colas, G. 1987. **Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P**. Theriogenology 27: 407-418.
- Torres, S., Sevellec, C. 1987. **Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe**. Reprod. Nutr. Dev. 27: 859-863.
- Trounson, A.Q.O., Moore, N.W. 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, J.C., Baril, G., Rougier, F., Chupin, D., Procureur, R., Corteel, J.M. 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, J.C., 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, J.C., 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, S.K., Smith, D.H., Seamark, R.F. 1986. **Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH**. J. Reprod. Fert. 77: 135-142.
- Walker, S.K., Smith, D.H., Frenshman, A., Ashman, R.J., Seamark, R.F. 1989. **The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos**. Theriogenology. 31: 741-752.
- Warwick, B.L., Berry, R.O., Horlachwer, W.R. 1934. **Results of mating rams to Angora females goats**. Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 225 (abstr.).
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P., 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, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A., Moor, R.M. 1976. **Deep freezing of sheep embryos**. J. Reprod. Fert. 46: 151-154.
- Wintenberg-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.I., 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.).