

- 
- **Materia:** FISILOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL II
  - **Tema:** Técnica de transferencia de embriones
  - **Carrera:** Medicina veterinaria y zootecnia
  - **Cuatrimestre:** 4º
  - **Alumno:** Edgar Uriel Encino López

## INDICE

INTRODUCCION.....	3
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES .....	4
SINCRONIZACION DE HEMBRAS.....	5
RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.....	6
EVALUACIÓN DE EMBRIONES .....	9
CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.....	11
CONCLUSION .....	16
BIBLIOGRAFIA.....	17

## INTRODUCCION

La transferencia embrionaria es el momento en el que después de una fecundación in vitro, los embriones en el útero de la madre ya han pasado todos los pasos previos de estimulación, obtención de ovocitos, obtención de semen y ya se han fecundado los embriones para devolverle a la madre los embriones

El éxito de una técnica de reproducción asistida dependerá en primer lugar de el material biológico y el potencial biológico de los embriones usados, en segundo lugar dependerá de la receptibilidad endometrial (ambiente que hayamos sido capaces de generar) y en tercer lugar la intervención

La transmisión potencial de enfermedades a través de los embriones es considerablemente menor que a través del semen o de animales vivos, gracias a la presencia de la zona pelúcida íntegra del ovocito, aunado a un adecuado procedimiento de lavado del embrión, previo a la congelación

El uso de la criopreservación de embriones dentro del proceso de transferencia de embriones, brinda una herramienta de suma utilidad, ya que a través de esta técnica podemos conservar durante un prolongado período de tiempo un embrión de excelente calidad, que permite utilizarlo cuando y donde se produzcan las condiciones favorables para lograr la preñez de las receptoras, o ser usada en algún lugar lejano de donde fue colectado.

## TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones es una técnica que consiste en recoger los embriones de una hembra gestante donante y transferirlos al útero de unas hembras receptoras, en las que se completará la gestación.

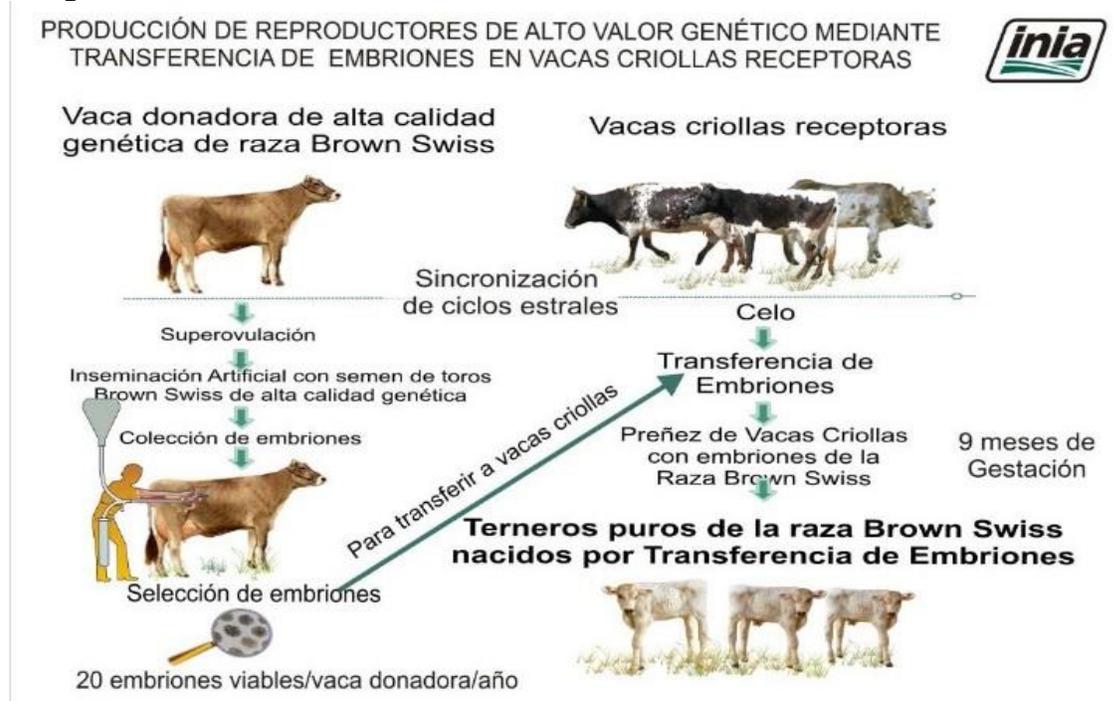
La principal aplicación de esta técnica es incrementar la intensidad de selección en los programas de mejora genética, al permitir obtener un elevado número de descendientes por unidad de tiempo a partir de las hembras de mayor potencial genético. Además, cuando se combina con semen sexado, facilita la obtención de individuos del sexo deseado para la selección, con una eficiencia del 90%. Sin embargo también puede utilizarse con fines sanitarios.

**La técnica se basa en el siguiente esquema:**

- Selección rigurosa de las mejores vacas (donadoras) a las cuales se le hace superovular (multiovulación).
- Selección rigurosa del semen de los mejores toros.
- Se insemina (2 a 3 veces) a las vacas donadoras con semen del mejor toro.

**Resultado:** en una vaca donante se logra en promedio 6 embriones por cada colección. Potencialmente a una vaca se le puede coleccionar 4 a 5 veces/año. Esto representa 24 embriones/vaca/año (método in vivo).

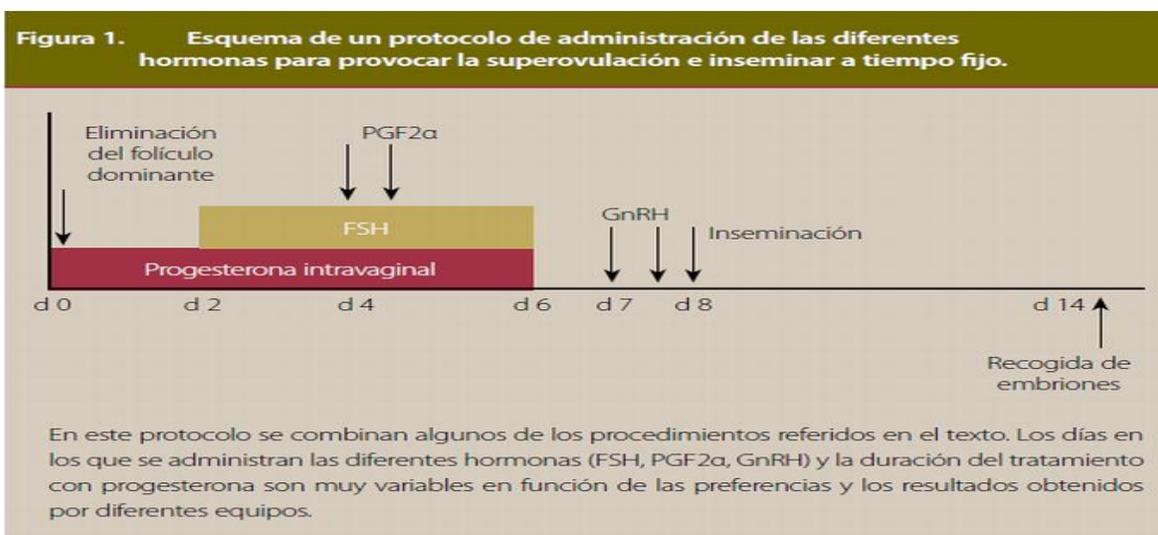
Luego de coleccionar los embriones, se transfieren los mismos a vacas criollas.



## SINCRONIZACION DE HEMBRAS

La técnica se inicia con la estimulación hormonal de la función ovárica de la hembra donante para provocar una ovulación múltiple, en lugar de la ovulación simple propia de esta especie. La hembra es inseminada en el momento apropiado y posteriormente, se permite a los embriones desarrollarse, en el oviducto y el útero de la donante, hasta que se recogen mediante el lavado uterino (flushing), que suele efectuarse en el día 7 del ciclo.

Los embriones recogidos pueden transferirse a las receptoras de manera inmediata, que llevaran la gestación a término, o conservarse a bajas temperaturas durante un periodo prolongado (criopreservación), que permitirá utilizarlos cuando se estime sea oportuno.



La supervivencia del embrión transferido depende de la sincronización del celo de la receptora con la donante. Esta sincronización es necesaria, para asegurar al embrión las mismas condiciones en el nuevo útero en que continuará su desarrollo.

Los mejores resultados son cuando la sincronización es exacta o las receptoras presentaron celo poco antes de las donantes, aunque se ha obtenido ligeramente mejores resultado cuando las receptoras presentan celo un día después de las donantes (+ 1 día). Esto puede ser debido a que el embrión sufra un retardo en su desarrollo por estrés durante el proceso de transferencia.

## MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN

“Existen dos métodos básicos para la sincronizar los ciclos estrales, los cuales dependen de la inhibición de secreción de LH o de acortar el tiempo de la vida del cuerpo lúteo y del inicio subsecuente del estro y la ovulación.

**Prolongación de la fase luteal:** el primer método requiere la administración de un progestágeno durante un periodo relativamente largo, de forma que el cuerpo lúteo tenga una regresión natural durante el tiempo en que la hormona se administra. Con este método, el progestágeno exógeno continúa ejerciendo retroalimentación negativa en la secreción de LH después de la regresión del cuerpo lúteo. Cuando se suspende el progestágeno se observa crecimiento folicular, estro y ovulación a los dos a ocho días.

**Acortamiento de la fase luteal:** el segundo método induce la regresión prematura del cuerpo lúteo cíclico (luteólisis). Los dos agentes luteolíticos principales son el estrógeno y prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$ .

El cuerpo lúteo es sensible a los agentes luteolíticos en todas las especies durante sólo algunas etapas determinadas de su desarrollo. Estos agentes no causan regresión del cuerpo lúteo en los primeros cuatro a seis días del ciclo.

La llave del éxito en cuanto a la sincronización de celos consiste en lograr sincronizar estrechamente la rápida caída de los niveles de progesterona por debajo de 1 ng/ml y el crecimiento sincrónico y la ovulación de un folículo viable.

## RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Los embriones destinados a un programa de TE pueden ser obtenidos del útero por medios no quirúrgicos. Su recolección y transferencia con éxito dependen de varios factores. En primer lugar de la resistencia de éstos para sobrevivir y llegar a término después de ser recolectados del tracto genital, evaluados in vitro y transferidos a un genital receptor, con cambios de medio y temperatura. En segundo lugar depende de que la técnica de obtención no ponga en peligro la integridad del tracto genital.

### **Circuito cerrado con flujo continuo:**

Con este método se emplean catéteres de 3 vías, rígidos o flexibles. Una vía, destinada a la inyección del medio de lavaje, se conecta al frasco que contiene la

solución por medio de una tubuladura de goma látex o silicona. La solución puede inyectarse por gravedad, colocando el frasco con el medio a aproximadamente 1 m por encima del frasco recolector o con una jeringa, con el mismo procedimiento que el método de flujo discontinuo. Por la segunda vía se inyecta aire o medio para llenar el balón y por medio de una tercera vía se recolecta la solución de lavaje, sin interrumpir la descarga.

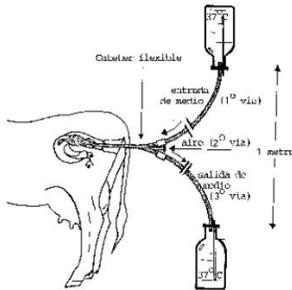


Fig. 2: Esquema del circuito cerrado con flujo continuo adaptado de ELSDEN (1976)

### Circuito cerrado con flujo discontinuo:

Con este método se usa el catéter de 2 vías, una jeringa de 50-60 ml , una válvula automática o manual, una unión de vidrio o plástico en forma de T o Y y las tubuladuras. La válvula, que se coloca a la salida del frasco, permite extraer el medio e inyectarlo en el interior del cuerno uterino. Luego de la inyección de un volumen variable de medio (30-50 ml) se interrumpe el flujo de llenado para proceder a la segunda maniobra; el cuerno es vaciado por la misma vía. Al ocluir la tubuladura de inyección la unión de vidrio en Y desvía el medio a la segunda tubuladura que lo conduce al frasco recolector.

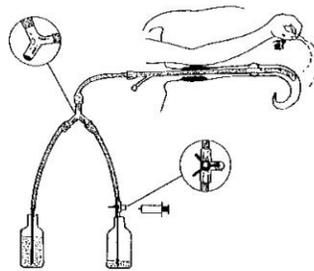


Fig. 3: Esquema de circuito cerrado con flujo discontinuo (adaptado de BRAND y HOOGEKAMP, 1986)

### Circuito abierto con flujo discontinuo

Inyección y recolección con una jeringa.

Esta técnica se emplea con los catéteres flexibles de 2 vías y no requiere de tubuladuras. El medio se inyecta y recolecta por la misma vía y con la misma jeringa (50 ml). Con ésta se descarga un volumen de medio fijado por el operador

quien, como en el caso anterior, debe palpar el cuerno uterino determinando y controlando su llenado a fin de evitar lesiones de la pared uterina por exceso de medio. Las maniobras siguientes variarán de acuerdo al tipo de técnica de lavaje que se aplique. Algunos operadores fijan y masajean el útero durante la inyección del medio. Esta operación es particularmente importante cuando el animal no está fijado con una elevación del tren anterior, que facilite el retorno del líquido de lavaje. Las dimensiones y peso del útero requieren que éste sea elevado por el operador. Cuando la donante es fijada con una elevación anterior algunos operadores no manipulan los cuernos uterinos, sólo verifican una vez el llenado. Luego retiran el brazo del recto y continúan con la inyección de medio hasta completar el volumen preestablecido de líquido. La recolección de los embriones en esta posición facilita el lavaje en animales con pariciones múltiples, aun cuando se emplee además el masaje de útero. Esta forma es aplicada en los Centros de TE donde ya se cuenta con la infraestructura necesaria. Presenta la ventaja que la manipulación no irrita al animal y facilita la operación. Mientras se descarga la jeringa en el frasco recolector el catéter es ocluido con una pinza hemostática o un clamp.

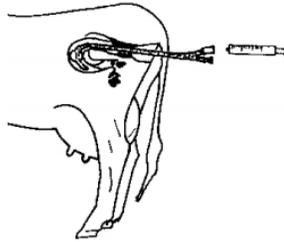


Fig. 4: Esquema del circuito abierto con flujo discontinuo. Inyección y recolección con una jeringa

## EVALUACIÓN DE EMBRIONES

La calidad embrionaria es un determinante importante para el éxito de los procedimientos de transferencia de embriones. Varios métodos se han reportado, pruebas de exclusión por coloración, las medidas de la actividad enzimática, captación de glucosa, y tinturas para diferenciar vivos y muertos, son útiles para predecir la supervivencia de los embriones después de la transferencia.

La evaluación de embriones sigue siendo uno de los métodos más subjetivos y cualitativos en la transferencia de embriones, Se identificaron cuatro categorías basadas en características morfológicas, es decir, excelentes, buenas, regulares, y pobres. Embriones con excelentes calidades y buenas calidades dan las mayores tasas de preñez, mientras que los embriones de pobre calidad arrojan resultados con menores tasas de éxito, lo que indica que la calidad del embrión puede ser un factor de predicción preciso de la tasa de preñez. Este método de evaluación consiste en la identificación de calidades del embrión en base a parámetros morfológicos tales como, la forma, el color, el tamaño del espacio perivitelino, el número de extrusión y células degeneradas, y el número y tamaño de las vesículas.

### Evaluación morfológica

#### Criterios

La evaluación morfológica de un embrión considera los siguientes criterios sobre las estructuras y calidades de un embrión de excelente calidad:

**Forma esferoide**  
**Simetría de los blastómeros**  
**Apariencia clara y neta de los blastómeros.**  
**Tonalidad oscura y uniforme**  
**Uniformidad de la membrana celular**  
**Proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino.**  
**Integridad de la zona pelúcida**  
**Ausencia de vacuolas en el embrión y bridas celulares en el espacio perivitelino**  
**Ausencia de detritus celulares adheridos a la zona pelúcida**  
**Compactación de los blastómeros entre si**

## Grados de calidad

La determinación del grado de calidad del embrión permite caracterizar en términos (más o menos) cuantitativos las posibilidades de desarrollo y posterior nacimiento de un ternero a partir del embrión obtenido. Los diferentes grados de calidad son determinados por medio de la observación microscópica de la morfología con ayuda de una lupa estereoscópica (0,7-6,4x).

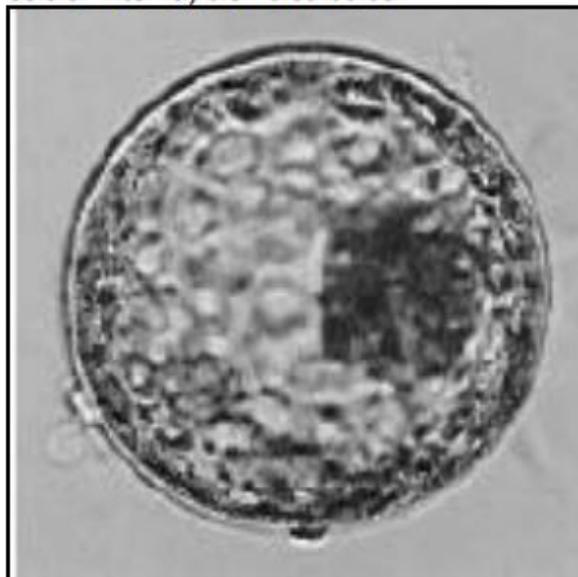
**G I:** Excelente, el desarrollo corresponde al día de la recolección. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniformes, simétricos, de forma esferoide y la zona pelúcida está intacta

**G II:** Bueno, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Su forma puede ser ligeramente irregular

**G III:** Regular, el embrión posee varios defectos: detritus celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida.

**G IV:** Malo, el embrión posee muchos defectos: los correspondientes al G III más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida -el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella-, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. Esta categoría es considerada como no transferible.

Figura 15. Blastocisto expandido, MCI (Masa celular interna) bien distribuida.



## **CONSERVACIÓN DE EMBRIONES**

La criopreservación es el proceso por el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente a la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido (-196°C), para disminuir las funciones vitales de una célula u organismo y poder mantenerlo en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. Esta técnica presenta ventajas biológicas y comerciales, permitiendo transportar embriones a cualquier lugar del planeta donde se encuentren las vacas receptoras; logrando muy buenos porcentajes de preñez que varían según la calidad del embrión y la técnica aplicada.

### **ETAPAS DE LA CRIOPRESERVACIÓN**

Básicamente, la criopreservación embrionaria contempla cuatro etapas:

- a) suspensión de los embriones en soluciones a la que se les ha adicionado crioprotectores,
- b) enfriamiento en condiciones tales que eviten la formación de cristales intracelulares cuando se sumergen en nitrógeno líquido (-196 °C),
- c) entibiamiento de los embriones a temperaturas fisiológicas para reasumir las funciones y,
- d) remoción de los crioprotectores (dependiendo del criopreservante del que se trate (4).

### **CRIOPROTECTORES**

Un crioprotector es un compuesto químico que permite la mantención de un tejido o de células por mucho tiempo cuando se las mantiene a baja temperatura. Los crioprotectores difieren en la velocidad para penetrar los tejidos, el grado de protección al cristal de agua que confieren y por la toxicidad química que pueden tener sobre las células. El grado de protección a las células está directamente vinculado al grado de asociación que tengan con el agua molecular. A mayor afinidad, menor el agua disponible para la cristalización dañina. Además, estos productos se utilizan en conjunto con los medios nutritivos líquidos que conforman las mezclas congelantes.

En la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

### **Permeables o intracelulares:**

De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma.

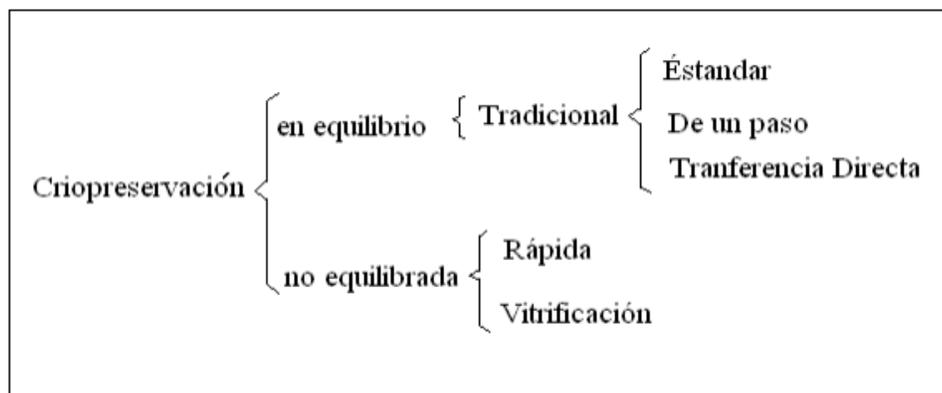
### **Impermeables o extracelulares:**

De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sacarosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua.

## **CONSERVACIÓN DE EMBRIONES**

Un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de los embriones recolectados de una donante antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% de suero fetal bovino que representa una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial, favorece la sedimentación, evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio.

## **TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES**



## **1. Criopreservación en equilibrio**

Las técnicas de criopreservación en equilibrio deben lograr un "equilibrio" entre la tasa a la cual el agua sale de la célula (deshidratación) y la tasa a la cual ese agua es incorporada a los cristales de hielo extracelular.

### **1.1. Tradicional**

Los crioprotectores (CP) utilizados en esta técnica son normalmente permeables. Los más frecuentemente utilizados son: glicerol y etilenglicol.

Durante la fase inicial de preenfriamiento, los embriones se exponen a la presencia del crioprotector en una fase que denominamos de equilibración. La respuesta inmediata del embrión ante la presencia de un CP permeable es una rápida disminución de volumen por pérdida del agua intracelular, hasta que se alcanza el equilibrio. Este fenómeno se debe a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular y a que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores; la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del CP. A medida que el CP penetra en el embrión, éste se expande gradualmente a causa de una reentrada de agua para el mantenimiento del equilibrio osmótico.

### **1.2. Estándar**

En la técnica de congelación estándar la exposición de los embriones al medio de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente (20 - 22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración. Este período incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas de 0.25cc. Lo que permite realizar rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o "seeding". Las pajuelas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajuelas con la del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajuela con una placa metálica o hisopo enfriado con nitrógeno líquido (NL 2); el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido, alcohol, etanol o metanol enfriado por medio de un compresor.

### **1.3. De un paso**

Desde el momento en que se demostró que la sacarosa podía ser utilizada para retirar el crioprotector de los embriones, surgió la posibilidad de

diseñar una técnica de extracción que se adaptara al trabajo en condiciones de campo.

Este procedimiento se basa en el uso de un crioprotector no permeable, como la sacarosa, que permite la remoción de un crioprotector permeable, como el glicerol. Con esta técnica, se pueden transferir los embriones directamente a la hembra receptora sin la necesidad de una evaluación microscópica previa a la transferencia y sin el repetido shock osmótico que sufren las células cuando se usa el método en etapas; de esta manera se erradica el procedimiento de dilución o extracción del crioprotector. No obstante, al prescindir de la evaluación morfológica post descongelación, es razonable esperar que los resultados de preñez sean inferiores.

#### **1.4. De Transferencia Directa**

se emplean crioprotectores altamente permeables tales como el etilenglicol o el 1,2 propilenglicol. En tal sentido, las pajuelas son descongeladas y el embrión es transferido directamente al útero de las receptoras. Como estos crioprotectores son altamente permeables, los embriones que son congelados y descongelados sufren un daño osmótico muy leve cuando son transferidos directamente a un ambiente isosmótico (útero).

## **2. Criopreservación no equilibrada**

El término no equilibrada, se usa para describir la criopreservación por procedimientos en los cuales las células y los tejidos no están en equilibrio con las altas concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables, antes de un enfriamiento rápido. Las altas concentraciones de crioprotectores causan una rápida deshidratación de las células y el enfriamiento ocurre antes del equilibrio osmótico entre el medio y el embrión. Los procedimientos de criopreservación no equilibrada, difieren de los procedimientos equilibrados en el logro de una mayor deshidratación y penetración de los crioprotectores previo al inicio del enfriamiento, logrando este enfriamiento en un solo paso.

### **2.1. Rápida**

Esta técnica es usada para describir la criopreservación de células que han sido parcialmente deshidratadas antes de ser sometidas a una tasa de enfriamiento rápido de 1250 °C/min. Un prerrequisito fundamental para criopreservar embriones exitosamente por este método, es usar una solución compuesta de una mezcla de 2 a 4,5 M de crioprotectores permeables, tales como el glicerol, el propanediol, el dimetilsulfóxido o el etilenglicol, y 0,25 a 0,5 M de crioprotectores no permeables tales como la sacarosa, la trehalosa, la lactosa o la galactosa (Gordon, 1994).

Después de un período de equilibrio (30 segundos a 3 minutos), los embriones en un estado parcialmente deshidratado son enfriados en temperaturas intermedias de  $-21^{\circ}\text{C}$  durante 35 minutos antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido.

## **2.2. Vitrificación**

La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre.

Durante el proceso de vitrificación, el embrión esta sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento. Esto se debería a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor número de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va aumentando en los espacios que aún no se congelan. Este choque osmótico es conocido como "efecto solución", y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia del embrión debido a la pérdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos.

El máximo daño en el embrión durante el enfriamiento ocurre de  $-15$  a  $-16^{\circ}\text{C}$  debido a la fase de transición de la membrana lipídica. Esta fase se ve afectada por la fusión de los liposomas afectando el termocomportamiento de las membranas en la transición de líquido a gel y la velocidad de penetración de los crioprotectores. El daño celular incluye pérdida de microvellosidades, disrupción de la membrana plasmática, cambios mitocondriales, hinchamiento del retículo endoplásmico, pérdida de uniones entre células así como fractura de zona pelúcida.

## CONCLUSION

La técnica de transferencia de embriones es de suma importancia para las especies objetivo de las explotaciones agropecuarias, mejora el rendimiento productivo normal de las hembras multiplicándolo en gran manera, preserva el material genético por mucho tiempo de animales cuidadosamente seleccionados, puede evitar la propagación de enfermedades de transmisión sexual y ayuda a la reducción de costos.

Es cuestión de que quien realice la práctica este realmente capacitado técnicamente y que propicie en medida de lo posible las condiciones adecuadas para llevar a cabo una buena recepción del embrión para la hembra de tal manera que reduzcamos los efectos negativos y aumentemos porcentaje de concepción.

Las condiciones de las hembras tanto donante como receptoras deben ser las mejores y la calidad del semen del macho debe ser la mejor de tal manera que en los procesos de la transferencia de embriones tengamos óptimos resultados.

## BIBLIOGRAFIA

- Belascoain María Gabriela, D. É. (2010). TECNICAS PARA LA CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS. 3-12.
- Palma, G. A. (2008). EVALUACION MORFOLOGICA DE LOS EMBRIONES. *REPROVIOTEC*, 3-6.
- Palma, G. A. (s.f.). RECOLECCION DE EMBRIONES. *BIOTECNOLOGIA DE LA PRODUCCION*.
- Pedro Garcia Herradon, L. Q. (2018). Transferencia de embriones en bovinos. *PORTAL VETERINARIA*.
- SALINAS, A. B. (2011). *PROTOSCOLOS DE SINCRONIZACION Y SUPEROVULACION PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS*. Recuperado el 01 de 12 de 2020, de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3050/1/mv167.pdf>
- SOMMANTICO, S. (2018). TRANSFERENCIA EMBRIONARIA. *Infocampo*.