

-
- **Materia: Fisiología de la reproducción animal II.**
 - **Tema:**
 - **Carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia.**
 - **Cuatrimestre: 4to.**
 - **Alumno: Alba Paulina Gómez Alvaro.**

ÍNDICE

- 1. INTRODUCCIÒN.....3
- 2. DESARROLLO.....3
 - 1. QUE ES TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....4
 - 2. SINCRONIZACIÒN DE HEMBRAS.....4
 - 3. RECOLECCIÒN DE EMBRIONES.....4-5
 - 4. EVALUACIÒN DE EMBRIONES.....6-7
 - 5. CONSERVACIÒN DE EMBRIONES.....7-9
- 3. CONCLUSIONES.....11
- 4. BIBLIOGRAFIA12

INTRODUCCION

Dentro de la producción ganadera, principalmente se buscan nuevas formas para lograr un manejo de producción adecuado para tener animales de mejor ganancia genética y mantener razas de valor. Para esto se han buscado nuevas formas para lograr nuevas maneras de mantener a estos animales, lo que se busca en la transferencia de embriones es mejorar la capacidad productiva y el nivel genético en una granja y por ende mejorar las ganancias. Esta técnica se ha perfeccionado en 1970 donde se han dejado de utilizar métodos quirúrgicos para su aplicación.

¿QUE ES LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES?

La transferencia embrionaria es una herramienta a disposición de los productores ganaderos, que se destaca por aumentar la eficiencia del rodeo, logrando buenos índices reproductivos y permite obtener una mayor producción pero sobre todas las cosas, la implementación de esta tecnología permite acelerar la ganancia genética con la contribución de ambos sexos.

Resumidamente, se trata de un procedimiento que comprende una serie de pasos. Primero se requiere de una hembra con buenos dotes genéticos y se estimula su ovulación por un tratamiento hormonal. Luego se procede a inseminar a la hembra en forma artificial con el semen del macho. Finalmente se transfieren los óvulos fecundados a los úteros de otras hembras (receptoras) donde continuarán su crecimiento y desarrollo.

Especialistas aseguran que este sistema no excluye a la inseminación artificial ni a la monta natural, sino que se complementan. La técnica se basa en lo siguiente:

- 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).

SINCRONIZACION DE HEMBRAS

La sincronización de celos poseen tratamientos con el uso de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), administrada al día 0, un agente luteolítico prostaglandina (PGF) en el día 7 y una segunda dosis de GnRH en el día 9 este protocolo es llamado Ovsynch que ha brindado rendimientos razonables. Otro método también utilizado es el uso de dispositivos con progesterona (P4) combinado con estradiol, proporcionando este una efectiva sincronización de la nueva onda folicular. En el momento de retirar el dispositivo se administra PGF. Luego de retirado el dispositivo se aplica estradiol o gonadotropina corionica humana (hCG) resultando en una efectiva sincronización de la ovulación y en aceptables tasas de preñez. Además, adelantando el momento de la aplicación de la PGF y administrando una dosis de gonadotropina corionica equina (eCG) se ha logrado incrementar las tasas de preñez en receptoras de embriones tratadas con dispositivos con PG y estradiol (11). La técnica de transferencia de embriones incluye varias etapas desde la selección de las donantes hasta la transferencia de embrión

RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Los embriones bovinos, 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, a fin de poder repetirla tantas veces como sea deseable y conveniente. La primera técnica de recolección de

embriones bovinos usada hace aproximadamente dos décadas, fue quirúrgica. La misma requería anestesia general, inducida por medio de barbitúricos y mantenida por medio de inhalación (halotano). Por medio de una incisión de 15 cm de longitud en la línea media, por delante de la glándula mamaria, se extraían los cuernos uterinos con los ovarios. El lavaje de los cuernos y oviductos se llevaba a cabo el día 5-7 introduciendo catéteres de goma a través de la pared dorsal del cuerno uterino y en la ampolla del oviducto. Cada cuerno era lavado con volúmenes variables de 40-60 ml de una solución buffer (M 199). La manipulación quirúrgica del útero y de los ovarios conduce a lesiones que provocan formación de fibrina y adherencias. Para minimizar ese efecto fue necesario trabajar con buenas condiciones de asepsia, lavando el útero y los órganos adyacentes con solución fisiológica estéril, conteniendo heparina. Con estas precauciones era posible llevar a cabo el lavaje a una vaca sólo tres veces como máximo, lo que constituye una seria limitante en el uso repetido de esta técnica. La tasa de éxito varió entre 50 y 70% de embriones y ovocitos obtenidos, en función del número de cuerpos lúteos presentes. Otra variante de la recolección quirúrgica fue el by-pass propuesto por TESTART y GODARD-SIOUR (1975), colocando la sonda a través de la pared uterina por medio de vaginotomía bajo anestesia epidural.: Método transvaginal (TESTARD y GODARD SIUR, 1975) Después de la colocación, el catéter de goma era fijado por medio de un balón inflable. El útero era lavado con 50-70 ml de medio. Esta técnica permitió obtener 40-50% de embriones. Las infecciones y adherencias en los cuernos uterinos y oviductos constituyeron las desventajas que limitaron, como en el caso anterior, la repetibilidad de la recolección e impidieron su difusión en la práctica. Ello provocó uno de los mayores cambios en la técnica de transferencia de embriones de la década del `70. La posibilidad de colocar en la especie bovina la sonda a través de la cervix abrió nuevas posibilidades a la recolección de embriones, simplificando el procedimiento y disminuyendo el trauma uterino. Para ello se crearon diferentes modelos de catéteres: rígidos (SUGIE y col., 1972), semirígidos (RASBECH, 1976) y flexibles (DROST, 1976; NEWCOMB y col., 1978; HAHN, 1978). Los mismos podían tener 2 vías, una para insuflar el balón de goma e inmovilizar el catéter y la

segunda para inyectar y recolectar el medio. RASBECH desarrolló en 1976 un sistema semirígido de recolección, a partir de una sonda Foley de 2 vías. El volumen de aire a insuflar oscilaba entre 12-15 ml. La inyección de medio se llevaba a cabo con una jeringa de 60 ml. La sonda Foley era introducida en un tubo rígido, quedando libre el extremo anterior, a partir del balón para el aire y el extremo posterior.

EVALUACIÓN DE EMBRIONES

Los embriones deben ser manejados con mucho cuidado para evitar causarles el mínimo daño. Para localizar, identificar, aislar, manipular y clasificar ovocitos infértiles y embriones se requiere considerable experiencia. Los embriones fácilmente pueden pasar desapercibidos así que cada caja Petri debe ser examinada por una misma persona dos veces y chequeada por otro técnico para rectificar o ratificar el número de embriones encontrados. Las donantes que son sometidas a un programa de superovulación, no ovulan al mismo tiempo sino en cascada, los embriones colectados mediante el lavado uterino en los días 7 – 8 después de la primera inseminación artificial, presentan diferentes estados de desarrollo. Por lo cual, al ser colectados en dichos días, las estructuras que se deben encontrar serán Blastocistos y Blastocistos expandidos. Es importante recordar que en el día 9 el embrión rompe la zona pelúcida (eclosiona), o sea queda desprotegido sobre todo de virus y bacterias (la legislación de la Asociación de Trasplante de Embriones 'IETS', no permite congelarlos). Podemos encontrar también blastocistos jóvenes y mórulas compactas. Si los embriones son de buena calidad en esos estadios se pueden transferir o congelar, embriones de calidad regular es conveniente implantarlos, aunque el porcentaje de gestación va a ser menor. El embrión de bovino tiene un diámetro de aproximadamente 160 μm (0.16mm) hasta el día 8 de desarrollo. Por lo tanto, se requiere de un microscopio estereoscópico (aumento de 10 a 40 X) para identificar los embriones. La morfología de los embriones de bovino es similar después de la fertilización hasta el día 9 de desarrollo. La zona pelúcida se pierde del blastocisto entre el día 8 y 10. En este periodo existe un gran riesgo de dañarlo por el manejo, además de que

son muy adhesivos y se pegan fácilmente a los tubos y a la cristalería. La identificación de los embriones se basa en varias características morfológicas: o La zona pelúcida es una estructura translúcida presente en todos los embriones hasta el día 9, se distingue fácilmente de otros desechos celulares y es utilizada como referencia. o El color del embrión (ámbar oscuro) facilita la identificación por que usualmente es más oscuro que otros desechos celulares.

- El embrión es esférico y tiende a moverse en el fondo de la superficie del plato.
- El conocimiento del estadio del embrión facilita su identificación.

Calidad Embrionaria

Se consideran los siguientes criterios sobre las estructuras y cualidades de un embrión de excelente calidad:

- ♣ Forma esferoide del embrión.
- ♣ Homogeneidad de los blastómeros.
- ♣ Tonalidad uniforme de los embriones.
- ♣ Homogeneidad de la membrana celular.
- ♣ Espacios proporcionales entre el embrión y espacio perivitelino.
- ♣ Zona pelúcida intacta.
- ♣ Carencia de detritus celulares y mucosidades adosadas a la zona pelúcida.
- ♣ Compactación o agrupación de los blastómeros entre sí.

CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

Los embriones bovinos son recolectados en una solución salina buffer fosfato (PBS Dulbecco) suplementada con 1% de suero o 0,1% de albúmina sérica (PBSS). A medida que los embriones son localizados bajo la lupa estereoscópica, se los coloca en PBSS con un porcentaje mayor de suero (10 ó 20%) o albúmina 4%. Permanecen en este medio, a la temperatura del laboratorio 20-25°C hasta que se realiza la transferencia o se lleva a cabo otra manipulación. La manipulación de los embriones in vitro se lleva a cabo siguiendo las disposiciones

establecidas por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) a fin de prevenir la transmisión de enfermedades. Una evaluación morfológica detallada, a mayor aumento, considerando estadios de desarrollo y cualidades estructurales permite determinar que embriones están en condiciones de ser transferidos. La transferencia en fresco debe ser realizada dentro de las 3-4 hs postrecolección. Los embriones pueden ser conservados in vitro para su posterior transferencia mediante: Cultivo a 37°C, refrigeración entre 0°C y 4°C o congelación a -196°C. A continuación, se analiza en detalle cada una de estas técnicas: Cultivo a 37°C Los embriones bovinos pre-implantados generalmente son recolectados entre el sexto y octavo día de vida, empleando el método no quirúrgico. El cultivo es utilizado para evaluar el resultado de distintas manipulaciones (congelación, micromanipulación, etc.) que se efectúan con los embriones pero no como un paso previo a la transferencia. Esto obedece a dos razones principales: En primer lugar, a que los embriones continúan desarrollando durante el cultivo, por lo tanto, esta técnica no puede ser utilizada para conservar un embrión hasta que una receptora asincrónica alcance el sincronismo óptimo. Por otra parte, se ha observado que los porcentajes de preñez disminuyen cuando se transfieren embriones que han sido cultivados, sostiene que la viabilidad embrionaria se ve seriamente disminuida cuando la extensión del cultivo es mayor de 24 horas. El cultivo de embriones se realiza en medios cuyo pH oscila entre el 7,2 y 7,6 y cuya osmolaridad varía entre 270 y 310 mOsm. El PBSS modificado por WHITTINGHAM (1971) es el medio utilizado comúnmente cuando el cultivo no se extiende por más de 24 horas. Los medios conteniendo bicarbonato, tal es el caso del Ham F-10 y del B2 de Menezo, son más apropiados para el cultivo de embriones pero requieren una atmósfera controlada, con presencia de CO₂ para mantener el pH fisiológico. Estos medios son utilizados en cultivos cuya duración es mayor de 24 horas). Al medio de cultivo, al igual que al de recolección, se le incorpora una fuente de proteínas. Esta se efectúa con la suplementación del medio de cultivo con 10% de suero ó 0,4% de albúmina. La suplementación proteica tiene distintos fines, los más importantes son: Cabodevila Biotecnología de la Reproducción www.reprobiotec.com 100 - Reducir la tensión superficial para

favorecer la sedimentación de los embriones y evitar que estos se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación.

- Incorporar sustancias promotoras del crecimiento que favorecen el desarrollo embrionario.

- Absorber e inhibir metales pesados tóxicos que pueden estar presentes en el medio. El medio de cultivo se esteriliza por medio de filtración a través de membranas de 0,22µm de diámetro de poro. Además, se le adicionan antibióticos, generalmente penicilina, estreptomocina y kanamicina. La temperatura corporal de la especie embrionaria en cuestión es la ideal para el desarrollo de los embriones in vitro. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo dejan de ser ideales

- ocurre fácilmente cuando se utilizan soluciones salinas balanceadas

- es conveniente que la temperatura del cultivo esté debajo de la corporal (no más de 4°C). De esta manera, los efectos tóxicos del medio son menos pronunciados y también es menor la evaporación (HEATH, 1990).

Refrigeración 0-4oC La refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBSS envasados en pajuelas de 0,25 ml y colocadas en un refrigerador (común o portátil) Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura, de manera similar a como se realiza la estabilización durante la congelación de semen. En los últimos años, con la transferencia no quirúrgica de embriones refrigerados durante uno a tres días, se han obtenido porcentajes de preñez que oscilan entre el 44 y el 50% . Estos resultados superan claramente a los obtenidos previamente (BON DURANT y col., 1982; BOUYSSOU y CHUPIN, 1982; LIDNER y col., 1982). A partir de los avances registrados, la refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la congelación. Por ejemplo, puede ser utilizada para enviar embriones a ser transferidos en lugares distantes de donde se encuentran las donantes (LEIBO y WINNINGER, 1986, REFSDAL y col., 1988). También puede emplearse esta técnica para conservar embriones hasta que receptoras asincrónicas alcancen la sincronización adecuada. Tabla 1: Resultados obtenidos con la transferencia no quirúrgica de embriones refrigerados. Duración de la refrigeración Embriones transferidos Receptoras preñadas Autor/res 24h 19 9 (47) REFSDAL y col. (1988)

48h 16 8 (50) BEZUGLY y col. (1988) hasta 72h 222* 98 (44) LINDNER (1985)

*De 227 embriones refrigerados, 5 fueron descartados en la evaluación morfológica realizada antes de la transferencia. Congelación a -196°C Es la técnica de elección para conservar embriones in vitro. Se considera que los embriones pueden ser mantenidos a -196°C durante doscientos años o más, sin afectar sus viabilidad y sin causarles cambios genéticos (SCHNEIDER y MAZUR, 1986). Este hecho, convierte a la congelación de embriones en una herramienta insustituible para el comercio internacional de reproductores.

CONCLUSIONES:

El mantenimiento de los vientres receptores es el mayor componente económico en la producción de terneros, a través de la transferencia embrionaria.

Es esencial en un programa de estas características, incluir una excelente nutrición y manejo, en colaboración con personal calificado.

VENTAJAS

- Producción de crías selectas a mayor escala (para venta o incremento de la intensidad de selección).
- Bajos costos de transporte de material genético de alta calidad.
- Disminuye el intervalo de generación en la selección de núcleos de reproductores
- Obtención de crías de vacas con problemas de fertilidad.
- Disminuye la propagación de enfermedades de transmisión sexual.

DESVENTAJAS

- Requiere de técnicas avanzadas y complejas
- Requiere investigación en las áreas de alimentación, reproducción, etc.
- Mayor costo comparado a la inseminación artificial; no obstante el beneficio económico es mayor.

BIBLIOGRAFÍA

- MAPLETOFT, R., y PIERSON R.A., 1993. Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. IETS Embryo Transfer Newsletter, 11: 14-24.
- MAPLETOF, 2006, “Transfer en CIA de Embriones en Bovinos” en Acceso en [Internet]. Disponibilidad [http://es.scribd.com/doc/45616594/Transfer-en-CIA-de-Embriones-enBovinos-ivis-Dr-Mapletof#outer_page_7].
- MORENO, J., 2004. Transferencia de embriones en bovinos. Texas, EUA.
- NODEN, D., y LAHUNTA, A. 1985. Early stages of development in bird and mammals. EnWilliams, & Wilkins, The embryology of domestic animals.
- Leibo, Embryo transfer in cattle. Lloyd Donaldson. LINDER, G., y WRIGHT, R., 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology,
- ORELLANA, J., y PERALTA, E. 2007. “Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International and Sexing Technologies”.
- ZAMORANO Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria Honduras, [en línea]. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf> ORTIZ, T; QUEZADA, T.; VACA, R; & RUIZ, D. 2007