



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ASPECTOS ACTUALES SOBRE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
EN BOVINOS**

SERVICIO PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

PRESENTA

CAROLINA JANETTE OLIVARES RODRIGUEZ

ASESOR:

DR. RODOLFO LUCIO DOMÍNGUEZ

Morelia, Michoacán, Junio del 2005.



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ASPECTOS ACTUALES SOBRE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
EN BOVINOS**

SERVICIO PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

PRESENTA

CAROLINA JANETTE OLIVARES RODRIGUEZ

Morelia, Michoacán, Junio del 2005.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

Documento No.924/2005

Se dictamina APROBAR la impresión definitiva del documento


Morelia, Mich., a 11 de julio de 2005

C. MVZ. Alberto Arrés Rangel
Director de la FMVZ-UMSNH
Presente.

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la tesina titulada **ASPECTOS ACTUALES SOBRE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS**, de la P.MVZ. *Carolina Janette Olivares Rodríguez*, dirigida por el MC. Raúl Ortega González, fue **revisada y aprobada** por esta mesa sinodal, conforme a las normas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ATENTAMENTE:


MVZ. Alberto Arrés Rangel
Presidente


Dr. Rodolfo Lucio Domínguez
Vocal


MC. Raúl Ortega González
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios

Por todas las bendiciones y por permitirme concluir esta importante paso en mi vida.

A mis asesores

Dr. Rodolfo Lucio Domínguez, Dr. Alberto Arres Rancel y Dr. Raúl Ortega González, por su asesoría y paciencia.

A mis padres y hermanos

A mis padres, Carolina Rodríguez Zavala y Juan Marcelo Olivares Palacios, a mis hermanos la Ing. Q. Yemina, Kethsia, P. Ing. Q. Juan Martín, Jochebeth Francis y Angélica María, por su infinita paciencia y estímulo para poder concluir este valioso objetivo.

A mis amigos

Dr. Nicolás Mucci, P.M.V.Z. Gregorio Muñoz, C. Maria del Consuelo Pedraza, Lic. Ma. De los Ángeles Zavala, P.MVZ. Gabriela Aguilar, P.MVZ. Yoshio Macswiney, Corresponsal Miguel Ángel Pérez Ríos, y mis compañeros de oficina, Lic. Frías, Lic. Mayte, al Ing. David Vázquez, Lic. Martín Samaguey, entre otros; por alentarme a continuar siempre hacia adelante, por su apoyo emocional, material, científico y por confiar en mí.

En general al personal de la facultad de Medicina Veterinaria

Por proveerme de las armas necesarias para concluir mis estudios.

DEDICADA A

 Mi hija **Jehosabeath Queren-Hapuc**, quien es y ha sido el mejor motivo de mi vida.

INDICE

INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. SELECCIÓN DE DONADORAS	3
2.1.1. Raza y edad	3
2.1.2. Estado fisiológico	3
2.1.3. Manejo y preparación	4
2.1.4. Sincronización previa	4
2.1.5. Superovulación	5
2.1.6. Inseminación de las hembras donantes	6
2.2. SELECCIÓN DE ANIMALES RECEPTORES	7
2.2.1. Raza y edad	7
2.2.2. Examen clínico	7
2.2.3. Sincronización del celo de las receptoras	8
2.2.4. Transferencia de embriones a receptoras	9
2.3. SUPEROVULACION	9
2.3.1. Prostaglandina F2alfa (PG F2alfa)	10
2.4. SINCRONIZACIÓN DE CELOS	11
2.4.1. Sincronización de celo en donadoras	11
2.4.2. Protocolos de sincronización	11
2.4.3 Protocolos de sincronización de celo en receptoras	12
2. 5. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	13
2.5.1. Características importantes	
que deben tener los medios para su uso	13
2.5.1.1. Temperatura	13

2.5.1.2. pH	13
2.5.1.3. Atoxicidad	13
2.5.1.4. Esterilidad	14
2.5.1.5 Nutrientes	14
2.5.1.6. Antibióticos y antimicóticos	14
2.5.2. El PBS Duplecco's (fórmula modificada)	14
2.6. METODOLOGÍA PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS	16
2.6.1. Esterilización del ambiente	16
2.6.2. Metodología para la elaboración del PBS	16
2.7. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE EMBRIONES	17
2.7.1. Fase previa o de preparación a la obtención embrionaria	17
2.7.2. Obtención embrionaria	18
2.7.3. Método no quirúrgico	20
2.7.4. Método quirúrgico	21
2.8. AISLAMIENTO DE LOS EMBRIONES	22
2.9. DESARROLLO Y MORFOLOGÍA EMBRIONARIA	24
2.10. CLASIFICACION DE LOS EMBRIONES	25
2.11. CRIOPROTECTORES UTILIZADOS EN LA CONSERVACIÓN DE EMBRIONES	27
2.11.1. Crioprotectores penetrantes de bajo peso molecular (permeables o intracelulares)	27
2.11.2. Crioprotectores no penetrantes de bajo peso molecular	27
2.11.3. Crioprotectores no penetrantes de alto peso molecular	28

2.12. CONSERVACION DE EMBRIONES	29
2.12.1. Congelación de embriones	29
2.12.1.1. Exposición de los embriones a las soluciones de congelación	29
2.12.1.2. Envasado de los embriones	30
2.12.1.3. Enfriamiento inicial	30
2.12.1.4. Inducción de la cristalización	30
2.12.1.5. Descenso térmico lento y controlado	31
2.12.1.6. Descenso térmico rápido	31
2.12.1.7. Almacenamiento en N₂ líquido	31
2.12.1.8. Descongelación	31
2.12.1.9. Extracción de los crioprotectores	31
2.12.2. Vitrificación de embriones	32
2.12.2.1. Exposición de los embriones a las soluciones de vitrificación	32
2.12.2.2. Envasado de los embriones en recipientes apropiados y en pequeños volúmenes	32
2.12.2.3. Descenso ultrarrápido de la temperatura (vitrificación)	32
2.12.2.4. Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológicas	32
2.12.2.5. Extracción de los crioprotectores	33
2.13. FACTORES QUE DETERMINAN EL RESULTADO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS	33
2.13.1. Calidad embrionaria	33
2.13.2. Estadio de desarrollo	33
2.13.3. Edad embrionaria	34
2.13.4. Criopreservación	34
2.13.5. Micromanipulación	35
2.14. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	35

2. 15. LIMPIEZA Y ESTERILIZACION DEL MATERIAL	
DEL LABORATORIO	37
2.15.1. Inmersión del material de laboratorio	37
2.15.2. Enjuague del material limpio	37
2.15.3. Ultimo enjuague	38
2.15.4. Secado del material	38
2.15.5. Empacado del material	38
2.15.5.1. Técnica o procedimiento	39
2.15.5.2. Tamaño del paquete	39
2.15.5.3. Sellado	39
2.15.5.4. Identificación del paquete	39
2.15.6. Métodos de esterilización	40
2.15.6.1. Método de esterilización calor húmedo	40
2.15.6.2. Esterilización a vapor	41
2.15.6.3. Esterilización por calor seco	41
2.15.6.4. Radiación Gamma	42
2.15.6.5. Uso de antisépticos y desinfectantes	42
2.16. INSTALACIONES	42
2.16.1. Área de elaboración de medios	42
2.16.2. Área de obtención de embriones	43
2.16.3. Área de búsqueda y evaluación	46
2.16.4. Área de congelación embrionaria	46
2.16.5. Área de descongelación embrionaria	47
2.16.6. Material y sustancias utilizadas en general	48
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CONSULTADA	50
ANEXOS	56

INTRODUCCION

La historia de la transferencia de embriones se remonta a 1981 cuando Heape realizo con éxito la primera transferencia embrionaria en conejos. A partir de entonces se han informado transferencias embrionarias exitosas en todo tipo de animales de granja (Hafez, 2002).

Durante las décadas de los ochenta y noventa, México se ha colocado a la vanguardia respecto a esta tecnología, teniendo en cuenta los tratados de libre comercio de América del Norte y América del Sur. La Transferencia de embriones (TE) es una biotecnología, que facilita el mejoramiento genético y el control de ciertas enfermedades en los mamíferos en los que se aplica (Aggen, 1987).

En la última década, la reproducción en ganado bovino ha evolucionado de manera acelerada marcando el inicio de una nueva etapa caracterizada por el desarrollo de una serie de técnicas que contribuyen a aumentar en forma rápida, la capacidad reproductiva y el mejoramiento genético en esta especie (Romo, 1993).

Dentro de un programa de TE, se utilizan hembras donantes y receptoras, las donantes son superovuladas y posteriormente inseminadas, después de éste proceso se obtienen los embriones, los cuales son colocados en úteros de hembras receptoras, estas últimas tienen el papel de concluir el desarrollo de los embriones (Hafez, 2002).

En estos programas se emplean donantes de alto mérito genético para la producción de leche o de carne. Los animales donadoras son sometidos a tratamientos hormonales de superovulación y posteriormente inseminadas artificialmente con semen congelado o fresco de toros de excelente calidad

genética, entre el día 6 y 8 posinseminación (PI), los embriones producidos se colectan mediante un lavado uterino transcervical logrando recuperar en promedio de 4. 5 embriones transferibles, algunas hembras donantes superan el promedio (Grupo Prion, 2002; Di-Bella, 2001).

Los embriones obtenidos se evalúan y procesan para ser transferidos finalmente a un grupo de hembras receptoras. Este proceso de colección de embriones puede ser repetido 3-4 veces al año con las mismas donantes, obteniendo un mayor numero de crías a partir de estos animales (Hafez, 2002).

Después de la obtención embrionaria, los embriones se evalúan y clasifican, acondicionándolos para su transferencia, esto depende del número de receptoras, o mediante la criopreservación, que es una forma de mantener a los embriones en condiciones adecuadas para su posterior transferencia.

1.1. El objetivo de este trabajo es documentar de manera actualizada, las técnicas para la colección, manipulación, evaluación, criopreservación y transferencia de embriones de bovinos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. SELECCIÓN DE DONADORAS

El examen clínico del aparato reproductor es un factor clave, por lo que la aplicación correcta de los métodos de la biotecnología requiere del conocimiento y actualización en fisiología reproductiva, así como de la farmacocinética y farmacodinamia de los agentes utilizados para la sincronización y superovulación (Arreseigor, 2003; Barrios, 2002; Munar *et al*, 1994).

La selección de la donadora depende de los objetivos del programa y de los requerimientos que deban cumplir desde el punto de vista biotecnológico y zootécnico (Hafez, 2002; Di-Bella, 2001).

2.1.1. Raza y edad. Dentro de cada raza o grupo se deben realizar estudios del potencial genético de cada hembra seleccionada, mismas que deben tener valores excelentes en cuanto a volumen de leche, porcentaje de proteína, sistema mamario, aparato locomotor (Arreseigor, 2003; Barrios, 2002; Fuentes *et al*, 2002; Romo, 1993).

La edad óptima se sitúa entre los 2 y 5 años. Cuando las donantes son terneras, la superovulación se puede realizar a partir de los 14–15 meses, siempre que los animales presenten un buen desarrollo corporal y un peso vivo aproximado de 350 Kg (Fuentes *et al*, 1992).

2.1.2. Estado fisiológico.

Vacas en producción. El intervalo parto superovulación (IPSOV) mínimo dependerá inicialmente del estado reproductivo de la donante, el cual se puede situar alrededor del día 60 posparto.

Estado de salud de la donante. Es recomendable una exploración ginecológica entre uno y tres días antes del inicio de la superovulación, en la que se confirmara la ausencia de cualquier proceso patológico, haciendo hincapié en la correcta involución uterina, la ausencia de metritis, ausencia de quistes ováricos, ausencia de un folículo de gran tamaño (>10 mm) y la presencia de un cuerpo lúteo indicativo del celo anterior (Munar *et al*, 1994; Fuentes *et al*, 1992).

Repetición de superovulaciones. Después de cada superovulación las donantes deben mostrar el celo y ciclar lo antes posible. Se recomienda la aplicación de una prostaglandina el mismo día de la colección, aunque normalmente no mostrara el celo, por lo que será preciso repetir el tratamiento de 11-15 días más tarde con este segundo tratamiento. Es necesario esperar entre cada superovulación un intervalo de 50-60 días para obtener buenos resultados (Fuentes *et al*, 1992; FAO, 1991).

2.1.3. Manejo y preparación. Hay que tener en cuenta que se deben mantener a los animales donantes en su ambiente normal, desde la inducción de la superovulación hasta el lavado y recogida de los embriones evitándose situaciones extraordinarias que desencadenen estrés como presentación a exposiciones y concursos. Los animales estresados no responden a los tratamientos hormonales para inducir la superovulación independientemente del producto o la dosis aplicada (FAO, 1991).

La condición básica para la buena reacción de un animal a los tratamientos hormonales es el bienestar del mismo. Situaciones de manejo esporádicas como sujeción para la inyección o la inseminación artificial son inofensivas. Pero cualquier práctica de manejo prolongada en el tiempo que estrese al animal se debe evitar también tras la superovulación, puesto que interfiere con el desarrollo normal de los embriones (Grupo Prion, 2002; FAO, 1991).

2.1.4. Sincronización previa. La sincronización del estro y la ovulación en un grupo de hembras permite predecir el momento del estro con un grado razonable de precisión, lo cual reduce el tiempo que se requiere para su detección (Hafez, 2002; Grupo Prion, 2002).

Es indispensable elaborar previamente un plan de sincronización, según el cual las hembras serán sincronizadas con una variación de ± 3 días y los celos de las donantes a nuestra disposición deben de presentarse con una diferencia temporal de menos de 7 días entre ellas. La sincronización previa de 4 a 5 vacas donantes para un programa de transferencia embrionaria es lo ideal porque, por un lado, se tiene la seguridad de tener ninguna hembra aunque falle una u otra y, por el otro, el lavado de 5 animales con las transferencias y/o la crioconservación de los embriones obtenidos es factible a lo largo de un día (Grupo Prion, 2002; Bó, *et al*, 2001; FAO, 1991).

La sincronización se puede realizar en un tiempo de 4 semanas posparto, en caso de vacas, y que no se presenten ninguna anomalía de tipo ginecológico que las haga rechazables como donantes. Es aconsejable administrar HCG o GnRH durante el celo para inducir la ovulación y estabilizar el ciclo (Grupo Prion, 2002; Mapletoft *et al*, 2002).

2.1.5. Superovulación. La superovulación consiste en la estimulación hormonal de la donante para la formación y desarrollo de varios folículos y su ovulación en ambos ovarios en un momento previamente fijado (Grupo Prion, 2002; Mapletoft *et al*, 2002; Hafez, 2002).

La mayor parte de las donadoras manifiesta el estro dos o tres días después de la inyección de prostaglandina (ver cuadro 1) (Hafez, 2002). Se debe poder diagnosticar claramente por vía rectal un cuerpo lúteo.

Cuadro 1. Protocolos para superovulación de hembras bovinas.

Pretratamiento	FSH ^a	PGF	LH
Progestageno durante 7-8 días	Inyectar 20-30 mg de FSH	Inyectar 1 000µg	Inyectar (IM) 25 mg de LH porcina (día 5)
Progestageno al día 7 + implante de GnRH	Inyectar 80 mg de FSH (días 0 al 4)	Inyectar 25 mg de PGF el día 2	

^a La dosis total de FSH se divide en cuatro dosis diarias decrecientes.

Fuente: Hafez, 2002.

La superovulación se puede inducir mediante la aplicación de una serie continuada de dosis decrecientes o iguales de hormona folículo estimulante (FSH). El celo superovulatorio se provoca finalmente con prostaglandina F2 α (Grupo Prion, 2002; Mapletoft *et al*, 2002; Bó *et al*, 2001).

El ciclo de la vaca tiene una duración media de 21 días (17 hasta 24) y el celo de aproximadamente 24 horas. Las novillas están en celo de 12 a 24 horas. El comportamiento de celo durante el estro superovulatorio se ve más acentuado en todas sus facetas respecto al del celo natural, sin embargo, no siempre se muestra en el momento esperado o a veces no aparece, lo que desencadena diferentes consecuencias para la TE (Grupo Prion, 2002; Hafez, 2002).

2.1.6. Inseminación de las hembras donantes. Debido a que las ovulaciones tienen lugar en momentos diferentes en un intervalo de tiempo amplio es necesario inseminar tres veces consecutivas cada 12 horas. Si la superovulación se ha inducido con FSH es conveniente aplicar en el momento de la segunda inseminación de 3,000 a 5,000 UI de HCG para reducir algo el intervalo de tiempo en el que se suceden las ovulaciones (Grupo Prion, 2002; FAO, 1991).

La inseminación se debe realizar con especial cuidado puesto que la inseminación repetida del animal aumenta el riesgo de contaminación por gérmenes, lo que disminuiría o anularía totalmente el éxito de la TE. También se debe evitar la exploración de los ovarios y de los folículos durante la misma porque conducen fácilmente a la ruptura de los folículos preovulatorios. Los ovocitos procedentes de ovulaciones así provocadas son inmaduros (Grupo Prion, 2002; FAO, 1991).

Es posible tener éxito con tan sólo dos inseminaciones si se programan dependiendo del comportamiento del animal donante (del comienzo del celo y de su duración), debiéndose llevar a cabo la primera inseminación de 8 a 10 horas tras el comienzo del celo y 10 a 14 horas después la segunda (Hafez, 2002; Grupo Prion, 2002).

2.2. SELECCIÓN DE ANIMALES RECEPTORES

Para la selección de las receptoras, si bien, las hembras receptoras no pueden transmitir sus genes, es necesario tomar en cuenta algunos factores, para obtener mejores resultados, los cuales se muestran a continuación:

2.2.1. Raza y edad. En general las razas lecheras son preferibles a las cárnicas por ser menos temperamentales y fáciles de manejar. Se recomienda utilizar a terneras por poseer un tracto reproductivo virgen (Grupo Prion, 2002; Fuentes *et al*, 1992).

Las terneras tienen ventajas debido a que consumen menos alimento, tienen mejor respuesta a la sincronización con PG y se obtiene un índice de preñez 5% superior a las vacas. Las desventajas con respecto a las vacas consisten en mayores problemas durante el parto, menor producción de leche durante su primera lactancia y un período de recuperación puerperal más prolongado (Munar *et al*, 2001).

2.2.2. Examen clínico. El examen ginecológico mediante palpación transrectal se complementa con la información de la anamnesis e historia clínica, los signos exteriores ambientales, la inspección, la vaginoscopía y la ecografía. Otros métodos complementarios incluyen la laparoscopia, biopsias y cultivos uterinos, determinaciones hormonales en sangre o leche, no siempre están al alcance de los clínicos de campo por razones de costo e infraestructura (Munar *et al*, 2001).

El objetivo de la exploración ginecológica es rechazar animales con anomalías (por ejemplo: órganos sexuales juveniles, hermafroditismo, ninfomanía y endometritis etc). También debe explorarse según su estado higiénico y analizarse enfermedades infectocontagiosas (leucosis, brucelosis, tuberculosis, BHV1, y BVD etc), antes de aceptarla como receptoras (Grupo Prion, 2002; Munar *et al*, 2001; Munar, 1994; Fuentes *et al*, 1992).

En condiciones normales, no se recomienda administración de vacunaciones sobre el hato 15 días antes o después de comenzado el programa de sincronización, colectas y TE, 15 días antes o después de las operaciones, para evitar picos febriles y otras causas de estrés (Munar *et al*, 2001).

La selección desde el punto de vista genético en las receptoras no tiene mucho sentido, aun cuando no se puede descartar del todo una influencia importante materna de la receptora sobre los embriones y su desarrollo (Grupo Prion, 2002).

2.2.3. Sincronización del celo de las receptoras. Se puede inducir con progestágenos (espirales o implantes subcutáneos) o con PGF2 α . En este último caso se le administra a las receptoras de 20 a 21 días antes de la transferencia la primera inyección de PGF2 α (presincronización) y el día 9° antes de la TE se administra la 2da dosis de PGF2 α , junto con la donante (sincronización) (Grupo Prion, 2002; Fuentes *et al*, 1992; McDonald, 1991).

Un método de sincronización alternativo al anteriormente descrito consiste en administrar la PGF2 α a las receptoras 12 horas antes de aplicársela a las donantes (cuadro 2). Los animales receptoras suelen presentar, por lo general, el celo inducido por PGF2 α algo más tarde que los tratados previamente con FSH o PMSG, lo que ayuda aún más a ajustar la sincronización entre donante y receptora. El celo sincronizado, será después del día 6° - 7° antes de la TE se puede administrar GnRH a las receptoras para estimular la ovulación y estabilizar el ciclo (Fuentes *et al*, 1992).

Cuadro 2. Técnica para sincronizar el estro en bovinos.

Método	Régimen de tratamiento	Fin del tratamiento al estro
gnRH +PGF	Inyectar GnRH (día), PGF (día 6)	Días 2-4: TAI
GnRH + PGF +GnRH	Inyectar GnRH (día 0), PGF (día 7), GnRH (día 8 o 9)	Días 2-4: TAI
Progestageno +estrógeno	Inyección de estrógeno (día 1), CIDR (días 1-9)	Días 3-5: AIDE/TAI
Progestageno + PGF	Progestageno (días 1-7), PGF (día 6)	Días 2-3 : AIDE/TAI

Fuente: Hafez, 2002.

Lo importante es que los animales muestren un celo patente en el momento adecuado, sincronizado con el de la donante y que en el momento de la transferencia presenten un cuerpo lúteo fácilmente palpable y bien estructurado (Fernández, 2003; Grupo Prion, 2002; Fuentes *et al*, 1992; McDonald, 1991).

Los mejores resultados de implantes se alcanzan, por lo tanto en casos donde, el día de la transferencia, se dispone de datos exactos sobre el celo de cada una de las receptoras (comienzo, intensidad y duración) (Grupo Prion, 2002).

2.2.4. Transferencia de Embriones a Receptoras

La fertilidad es el diagnóstico más fiable de la viabilidad embrionaria además de ser objetivo último de cualquier técnica artificial de reproducción. El embrión al ser transferido ha de encontrar un ambiente uterino lo más similar posible al que le soportaba en el animal donante. Los embriones son depositados en la receptora mediante el método transcervical, el cual consiste en atravesar el cuello uterino de forma similar a como se realiza en la inseminación artificial (De la Fuente, 2002; FAO, 1991).

2.3. SUPEROVULACION

Se entiende por superovulación, durante un ciclo estral normal, a la producción de un número más elevado de óvulos de los que son considerados normales para la especie. Su principal objetivo del tratamiento es incrementar la cantidad de oocitos ovulados por un animal, y por consiguiente el número potencial de embriones (Grupo Prion 2002; FAO, 1991; McDonald, 1991).

La inducción de la superovulación se sucede en el diestro entre el día 8 y 14 del ciclo mediante la inyección de hormonas gonadotropinas como la FSH, PMSG o HCG (ver cuadro 3) (Hafez, 2002; Grupo Prion, 2002; McDonald, 1991).

2.3.1. Prostaglandina F2 α (PG F2 α). El uso de PG F2 α natural por vía parenteral presenta dos inconvenientes: se requieren dosis muy grandes y, por otro lado, existe el riesgo de aparición de efectos secundarios. Por este motivo se han desarrollado análogos sintéticos mucho más activos (con lo que se requieren dosis menores) y exentos de efectos secundarios (Mazzucchelli *et al*, 2002; FAO, 1991).

La única actividad útil que desarrolla la PG F2 α es la luteólisis. Al momento de administrarla hay que tener en cuenta que para que actúe es indispensable la existencia de un CL (cuerpo lúteo) funcional. El tiempo que transcurra hasta la manifestación del celo del animal dependerá del estado del CL en el momento de la administración; este tiempo suele oscilar entre 3 y 5 días (Domínguez *et al*, 2002; Mazzucchelli *e.t.al*, 2002; McDonald, 1991; Munar, 2003).

Las inyecciones subcutáneas o intramusculares de eCG o FSH estimulan el crecimiento adicional de folículos, los cuales ovularán de manera espontánea sin necesidad de LH o HGC exógena.

En virtud de que la FSH tiene una vida media más corta que la eCG, se divide la dosis total y se inyecta a intervalos de 12 horas durante tres o cuatro días para estimular la misma cantidad de crecimiento folicular que resultaría de una sola inyección de eCG.

Cuadro 3. Métodos de superovulación.

Pretratamiento	Gonadotropina^a	PGF	LH
Progestageno durante 7-8 días	Inyectar 20-30 mg de FSH	Inyectar 1 000 μ g de Gonadotropina	Inyectar (IM) 25 mg de LH porcino (día 5)
Progestageno al día 7 + implante de aGnRH ^b	Inyectar 80 mg de FSH (día 0 al 14)	Inyectar 25 mg de PGF el día 2	

^a La dosis total de FSH se divide en cuatro dosis diarias decrecientes

^b Esponja: dispositivo intravaginal.

Fuente: Hafez, 2002.

El protocolo con agonista de GnRH (desloreneo)-LH controla el momento de la ovulación después de la hiperestimulación con FSH. El agonista de GnRH (implante de desloreneo) bloquea la oleada preovulatoria de LH, mientras que la inyección exógena consecutiva de LH induce la ovulación. En este protocolo se insemina a la donadora de forma concomitante con la inyección de LH, lo cual no requiere de la detección del estro (Hafez, 2002; Grupo Prion, 2002; McDonald, 1991).

Posteriormente a la superovulación de las hembras donadoras y receptoras se debe sincronizar el celo, esto se hace con el fin, de implantar al embrión en el útero de la receptora en las condiciones más adecuadas para la continuación de su gestación, tema que se explicara a continuación.

2.4. SINCRONIZACIÓN DE CELOS

Para una mayor comprensión de este tema, se expone de forma separada, teniendo en cuenta que es simultáneamente tanto para receptoras como donadoras. En primer término se explica el método de la donadora y subsecuentemente para la receptora.

2.4.1. Sincronización de celo en donadoras. Una forma de sincronizar el celo en las donantes es mediante la administración de PGF2 α o sus análogos sintéticos o prolongar la fase luteal de manera artificial mediante la administración de progesterona o progestágenos, esta opción es la mas utilizada actualmente dado que permite el programa independientemente de que las donantes tengan un cuerpo lúteo funcional (Fernández, 2003; Grupo Prion, 2002; Hafez, 2002; Palma, 2002).

2.4.2. Protocolos de sincronización. Para la sincronización del estro en bovinos se puede utilizar dos inyecciones de PGF2 α con 11 o 12 días de diferencia, después de la segunda inyección, el animal debe aparearse o

someterse a IA cuando se detecta el estro, o debe inseminarse a las 72 y 96 horas sin referencia al estro (Fernández, 2003; Hafez, 2002; Palma, 2002).

O bien utilizar progestágeno y PGF2 α , administrando progestágeno a modo de dispositivo vaginal durante siete días, con una inyección de PGF2 α al sexto día. Las vacas se inseminan de acuerdo con el estro alrededor de 84 horas después de la inyección de PGF2 α (Fernández, 2003; Hafez, 2002; Palma, 2002).

Otra opción más es la utilización de progestágeno y estrógeno, inyectando un estrógeno y un progestágeno el primer día del tratamiento. Al mismo tiempo se implanta un progestágeno que permanece colocado de bajo de la piel de la oreja durante 9 días. Las vacas se inseminan en un momento programado (TAI) (54 horas) después de la extracción del implante (Fernández, 2003; Hafez, 2002; Palma, 2002; McDonald, 1991).

2.4.3. Protocolos de sincronización de celo en receptoras. La transferencia de embriones puede efectuarse indistintamente sobre celo natural o inducido; el celo de las receptoras deberá tener una sincronización no mayor a \pm 24 horas con el de la donante a un útero que esté bajo la influencia hormonal y en un estado fisiológico, motilidad y secreciones, correspondiente a siete días del ciclo estral (Fernández, 2003; Grupo Prion, 2002; Palma, 2002; Munar *et al*, 2001; Munar, 1994).

El promedio de embriones transferibles por cada donante es alrededor de 5, se sincronizan 8 receptoras por donante dado que algunas se deben ser descartadas antes de efectuar la transferencia por razones diversas, quistes ováricos, celos anovulatorios, imposibilidad de cateterizar el cérvix (Palma, 2002; Munar, 1991; FAO, 1991).

Para la sincronización del celo en receptoras, se puede utilizar prostaglandina, progestágenos (espirales-PRID o implantes subcutáneos) (Grupo Prion, 2002; Palma, 2002; Munar *et al*, 2001; Munar, 1991).

Los dispositivos intravaginales son combinados al momento de su colocación con progesterona y benzoato de estradiol para controlar la dinámica folicular; al retirarlos se inyecta prostaglandina y 24 horas más tarde benzoato de estradiol para controlar la ovulación. El celo ocurre el día siguiente a la extracción de los dispositivos y al momento de efectuar la transferencia, se descartan todas aquellas receptoras que no posean un cuerpo lúteo mayor de 15 mm, determinado mediante ultrasonografía (Palma, 2002; Munar *et al*, 2001).

2. 5. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

La correcta elaboración de los medios es fundamental para asegurar la calidad y el estadio de los embriones colectados, así como su manipulación, congelación y descongelación.

2.5.1. Características importantes que deben tener los medios para su uso.

2.5.1.1. Temperatura. La temperatura ideal es de 38.5° C por ser la temperatura corporal de la donadora. El embrión puede soportar temperaturas menores de hasta 22° C durante cortos períodos sin que estos disminuyan significativamente su viabilidad y desarrollo posterior (Astiazaran *et al*, 1987; Armada *et al*, 1985).

2.5.1.2. pH. El pH óptimo para los embriones es de 7.2 a 7.6, aunque los embriones de bovino toleran desviaciones sustanciales de pH durante cortos periodos (Boggio, 2003; Hafez, 2002; FAO, 1991; McDonald, 1991; Armada *et al*, 1985; Astiazaran *et al*, 1987).

2.5.1.3. Atoxicidad. La presencia de compuestos químicos u orgánicos en los medios daña o destruye a los embriones; incluso cantidades muy pequeñas de ciertos metales, como el plomo o el mercurio perjudican de manera irreversible la viabilidad de los embriones. Se recomienda el uso de agua bidestilada o

tridestilada con un buen control de calidad. Actualmente se emplea agua ultrapura obtenida a partir de modernos equipos que utilizan el principio de ósmosis inversa para purificar el agua.

2.5.1.4. Esterilidad. La solución debe estar libre de microorganismos, se debe trabajar con mucho cuidado para no contaminarla (Astiazaran *et al*, 1987; Armada *et al*, 1985).

2.5.1.5 Nutrientes. Los medios utilizados en transferencia de embriones corresponden a soluciones salinas (por lo general PBS + antimicrobianos) a las cuales se les adiciona macromoléculas tales como el suero bovino (fetal, de vaca en celo, de novillo) ó la Albúmina Sérica Bovina (ASB).

El suero contiene el complemento, el cual una vez activado por su vía alterna, puede dañar al embrión, por este motivo se debe inactivar mediante incubación en baño María a una temperatura de 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se esteriliza por filtración utilizando filtros de 0.22 µm. Tanto el suero como la ASB protegen a los embriones de los metales pesados (debido a sus propiedades quelantes) y disminuyen la tensión superficial de los medios, evitando que se adhieran al equipamiento (Hafez, 2002; Astiazaran *et al*, 1987; Armada *et al*, 1985).

2.5.1.6. Antibióticos y antimicóticos. Se agregan con el fin de evitar contaminación, generalmente se utiliza penicilina G sódica, o procaínica, estreptomina y algún antimicótico (Hafez, 2002; Astiazaran *et al*, 1987; Armada *et al*, 1985; Austin *et al*, 1982).

2.5.2. El PBS Doblecco's (fórmula modificada). Es la base para la elaboración de los distintos medios utilizados en la técnica de transferencia embrionaria. Al medio pueden adicionársele diversas sustancias como son: suero fetal bovino (SFB), albúmina sérica bovina (ASB), glicerol o sacarosa.

Presentaciones del PBS en el mercado:

1. solución líquida lista para utilizarse
2. en polvo, presentación en sobres que contienen las sales, las cuales son fáciles de reconstituir.

Resulta más económico preparar el PBS a partir de su presentación en polvo, para su elaboración se requiere pesar las sustancias en una balanza analítica y utilizar agua bidestilada o tridestilada estéril (ver cuadro 4). Antes de ser utilizado, se recomienda evaluar el pH y la osmolaridad para comprobar su correcta formulación y así evitar afectar la viabilidad de los embriones (Hafez, 2002; Armada *et al*, 1985).

El PBS no requiere de una atmósfera con elevada presión parcial de CO₂ para mantener estable su pH debido a que está amortiguado con fosfatos. Al PBS puede adicionársele un indicador de pH como el Rojo de Fenol. Cuando el color varía a violeta o amarillo indica alcalinidad o acidez en el medio, respectivamente (Boggio, 2003; FAO, 1991).

Cuadro 4. Fórmula modificada por Dulbecco para la preparación de 10 litros de PBS.

Sustancia	Cantidad
CaCl + H ₂ O	1.32g
MgSO+ ₇ H ₂ O	1.21g
NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	11.5g
KH ₂ PO ₄	2g
Glucosa	10g
Sulfato de Estreptomina	0.5 2,5g
Piruvato de Sodio	0.36g
Penicilina G Sódica	1' 000,000 U.I. /10 litros
Rojo de Fenol	50 mg/10 litros

Fuente: Hafez, 2002.

Actualmente se ha dejado de adicionar antibióticos y antimicóticos en la elaboración de los medios, esto no es necesario si se tiene cuidado en la preparación de los mismos, siendo un ambiente estéril en donde se debe llevar a

cabo este proceso. Para ello se debe conocer la metodología de la elaboración de los mismos. Tema que se explica a continuación.

2.6. METODOLOGÍA PARA LA ELABORACIÓN DE MEDIOS

2.6.1. Esterilización del ambiente. Para controlar y obtener un ambiente estéril en una área o habitación determinada se utiliza una campana de flujo laminar, la cual debe encenderse como mínimo dos horas antes de iniciar la elaboración de los medios. También se puede esterilizar en un área reducida (Munar, 2004).

2.6.2. Metodología para la elaboración del PBS. El medio PBS comercial se prepara utilizando dos sobres, uno de ellos con CaCl_2 y MgCl_2 , y el otro con los demás sales. El almacenamiento y dilución de las sales se efectúa por separado el CaCl_2 y MgCl_2 se mezcla con el 20% del volumen total de agua mientras que las sales se mezclan con el 80% restante del volumen de agua. Ambas mezclas deben ser agitadas vigorosamente. Una vez obtenidas estas dos diluciones, se procede a mezclarlas y reconstituirlas (ver cuadro 5).

Cuadro 5. Preparación de medios.

Uso	PBS	Albúmina Sérica Bovina		Suero Fetal Bovino	Glicerol	Observaciones
Lavado uterino	Si	0.4%	o	1-2%	No	Ninguna
Lavado de filtro Emm_com	Si	No	ó	No	No	Si se utiliza ASB o SFB se produce espuma y dificulta la búsqueda embrionaria
Mantenimiento	Si	0.4%	ó	10%	No	Se utiliza una caja de Petri 35 x 10 donde se van a depositar los embriones que se encontraron en la caja de búsqueda
Lavado de embriones para la congelación	Si	0.4%	ó	10%	No	Ninguna
Congelación	Si	0.4%	ó	10%	No	Ninguna

Fuente: FAO, 1991.

2.7. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE EMBRIONES

El término de transferencia embrionaria, tomado literalmente, se refiere solamente a la obtención de un embrión de un animal donante y su colocación en el oviducto o útero de una receptora (Boggio, 2003; Grupo Prion, 2002; Di-Bella, 2001; McDonald, 1991).

El momento más apropiado para la realización de la obtención embrionaria es entre los 6.5 y 8 días de iniciado el estro, momento en el cual los embriones se ubican en el extremo anterior del cuerno uterino y mediante el lavado son fácilmente arrastrados al exterior flotando en el medio. La etapa de los embriones en ese momento es en el estadio de blastocisto o de mórula, fases muy estables, lo que hace posible que sean transferidos directamente o que soporten otras manipulaciones (De la Fuente, 2002; Grupo Prion, 2002; Hafez, 2002; Di-Bella, 2001; Munar, 2001).

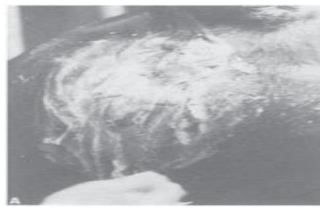
La palpación de los ovarios por vía rectal, puede orientar sobre el posible número de embriones que se van a colectar, según sean los cuerpos lúteos palpables (Grupo Prion, 2002).

Existen dos metodologías para obtener embriones bovinos, estas son la técnica quirúrgica y la no quirúrgica. Actualmente la técnica no quirúrgica es el método más utilizado de obtención de embriones mas empleado, ya que ofrece mayor seguridad para la donadora y se puede practicar en repetidas ocasiones (Munar, 2004; Hafez, 2002).

2.7.1. Fase previa o de preparación a la obtención embrionaria. Los animales que se incorporan a este tipo de programa entran en perfecto estado físico, clínico y reproductivo. Como medida de seguridad, los técnicos deben de contar con el equipo y ropa necesaria: overol, botas de hule, guantes de palpación, cubrebocas y lentes, a fin de evitar cualquier contacto con los fluidos corporales de los animales al humano (Thibier, 2002).

La donadora se debe colocar en una trampa que le brinde comodidad y seguridad. El piso debe ser antiderrapante y con una elevación anterior de 15°, permitiendo que las vísceras se retraigan hacia atrás, facilitando la manipulación de los órganos genitales. Cuando sea necesario, podrá tranquilizarse el animal inyectando maleato de acepromacina o xilacina por vía intramuscular. Una vez que el animal se encuentra en la trampa se le inmoviliza sujetándolo por el cuello y se le coloca un tubo a la altura de la tibia para evitar que patee y lastime al técnico que realiza la obtención embrionaria. Después se lava la parte posterior del animal con agua y jabón, eliminando por completo la tierra, pastura y estiércol (ver figura 1) (Thibier, 2002).

Figura 1. Lavado de la región vulvar.



Fuente: FAO, 1991.

El animal se rasura, se lava y desinfecta al nivel de las última vértebra sacra y primera coccígea con benzal o alcohol al 70% y se inyectan 5 ml de lidocaína al 2 ó 3% por vía epidural (ver figura 2) (McDonald, 1991).

Figura 2. Sitio de la Anestesia Epidural.



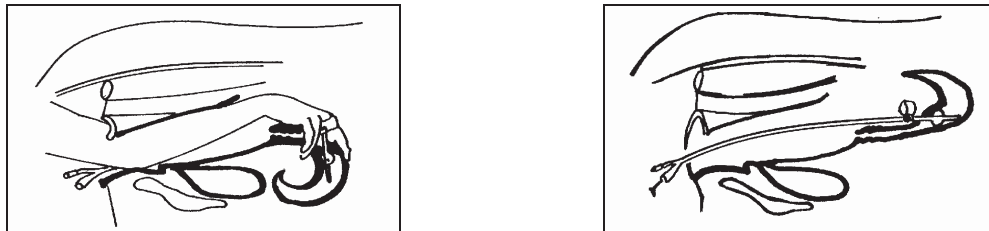
Fuente: FAO, 1991.

Una vez que se ha insensibilizado la región se reducirán las contracciones rectales y se podrá introducir la mano para extraer el estiércol, esto facilita la manipulación de los órganos genitales (Hafez, 2002).

2.7.2. Obtención embrionaria. Antes de iniciar la colección embrionaria se prepara el siguiente material: se conecta una manguera, un filtro y un frasco con medio de PBS, con el propósito de enjuagar la manguera y el filtro, finalmente la maya del filtro y la manguera debe permanecer con medio, evitando así que los embriones se deshidraten. El filtro, la manguera y el frasco con medio de PBS se colocan en un lugar seguro, a la sombra y protegidos con una bolsa de plástico para evitar que se ensucien con estiércol (ver figura 3).

2.7.3. Método no quirúrgico (Método transcervical). Esta técnica requiere del uso de un catéter de tres vías para recolectar embriones en el ganado bovino (Hafez, 2002; FAO, 1991; McDonald, 1991).

Figura 3. Método transvaginal.

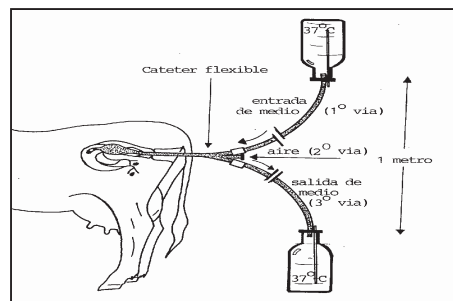


Fuente: Mucci, 2004.

Posteriormente se lava la región vulvar y se introduce el catéter de obtención embrionaria transcervical provistos de un balón inflable, la sonda se introduce con mandril o fiador, para hacerla rígida, a través de la vagina, cervix y cuerpo uterino hasta uno de los cuernos. Cuando el extremo de la sonda se halla en la curvatura mayor del cuerno uterino se retira el mandril de 8 a 10 cm y se sigue avanzando con cuidado la sonda flexible en dirección craneal (Grupo Prion, 2002; De la Fuente, 2002; McDonald, 1991).

Posteriormente se retira el mandril y se conecta el extremo posterior de la sonda a la manguera. Los dos extremos restantes de la sonda se conectan, uno en el frasco de PBS para efectuar el lavado uterino y el otro al filtro. A continuación el cuerno uterino se dilata con el ingreso de 5 u 8 ml de PBS hasta llegar a una gestación de 30-35 días, luego se abre la vía de salida y se cierra la de entrada con un clamp (ver figura 4) (Grpo Prion, 2002; Hafez, 2002; Di-Bella, 2001; FAO, 1991).

Figura 4. Muestra de la colecta de embriones sin filtro en línea.



Fuente: Mucci, 2004.

El flujo del medio ocasiona que los embriones se desprendan del endometrio. Durante este proceso la mano derecha debe permanecer introducida en el recto y a través de su pared se facilita, primero la introducción de la sonda, y a través de su pared se facilita, la introducción de la sonda, y en este paso, los masajes uterinos para enjuagar bien el útero. Así mismo se realiza un masaje suave con las yemas de los dedos que se encuentra el globo de al sonda. Después se desaloja el líquido del cuerno uterino abriendo el clamp al mismo tiempo que se ejerce un masaje. El medio llega al filtro por gravedad, se debe cuidar que el medio no se derrame para evitar la pérdida de embriones. Esta operación se repite de 3 a 5 veces en cada cuerno uterino (Grupo Prion, 2002; FAO, 1991).

Una vez terminada la obtención embrionaria del cuerno uterino de mayor respuesta, se desinfla el globo y se introduce de nuevo el estilete previamente desinfectado, a la sonda que se dirigirá ahora al cuerno uterino donde hay una

menor respuesta de superovulación, llevando a cabo la misma operación (Grupo Prion, 2002).

El medio resultante de la recogida se mantiene a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los embriones, debiéndose evitar oscilaciones de temperatura. El medio de lavado que refluye se recoge en un matraz o en una probeta o se conduce directamente a través de un filtro de embriones. La utilización del filtro de embriones integrado en el sistema optimiza el proceso (Grupo Prion, 2002).

2.7.4. Método quirúrgico. En la mayoría de las donantes la recolección se realiza entre el 5 y 7 día después del estro, muchos de los embriones en este momento, han atravesado los oviductos y se realizan en la porción proximal del cuerpo uterino. Algunos autores han demostrado una tasa máxima de recuperación de embriones uterinos cuando la colección se realiza 5 días después del estro.

La recuperación quirúrgica de embriones se lleva a cabo con la donadora bajo anestesia general. El alimento y el agua deberán ser retirados de 24 a 36 horas antes de la operación. Este periodo de régimen preoperatorio es crítico, ya que tienden a timpanizarse con rapidez, lo cual hace difícil la exposición del tracto reproductivo (Grupo Prion, 2002; McDonald, 1991).

Se realiza por incisión de la línea media de la donante previa anestesia; se exterioriza el tracto reproductor, se atraviesa la fimbria del oviducto por medio de una cánula revestida con teflón de 1 a 2 mm de diámetro interior. Una vez que la cánula se asegura en su sitio, el cirujano introduce una aguja roma a través de la pared del útero, dentro del lumen uterino e irrigado retrógradamente a través del tubo con el útero, extrayendo del oviducto canulado, fluido el cual es depositado en un pequeño vaso colector. Por lo general, son suficientes 25 a 50 ml para lograr la recuperación (McDonald, 1991).

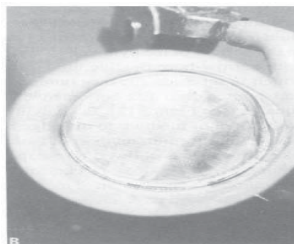
Esta metodología también puede lograrse abordando el abdomen mediante una incisión en la región, flanco el aparato reproductor, se colocan pinzas cerca

de la punta a través del oviducto al ovario; este líquido transporta al óvulo y se colecta en el infundíbulo. El procedimiento permite la recuperación de un alto porcentaje de óvulos, pero debido al traumatismo quirúrgico y a sus secuelas, solo se puede repetir unas pocas veces más. Algunas de las desventajas son las adherencias fibrosas que se pueden llegar a formar en abdomen, además de la necesidad de anestesia y la dificultad de operar animales de mucha producción lechera (Hafez, 2002).

2.8. AISLAMIENTO DE LOS EMBRIONES

Los recipientes con la solución resultante del lavado de embriones se mantienen a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los mismos. No se debe superar bajo ningún concepto una temperatura ambiente de menos de 20°C. Para ello se vierte toda la solución exceptuando los últimos 50 ml, por un filtro de embriones o bien se aspira el sobrenadante después de que los embriones hayan sedimentado. Dicha sedimentación dura entre unos 15 ó 20 minutos (Grupo Prion, 2002; McDonald, 1991).

Figura 5. Lavado de embriones.

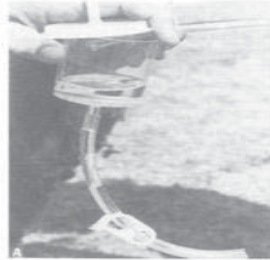


Fuente: FAO, 1991.

Se utiliza un filtro de embriones (con un tamaño de poro de 70 μ m), se vierte la solución de lavado directamente sobre el filtro, agitando simultánea y suavemente el recipiente hasta vaciarlo; con la agitación se pretende evitar que los embriones que hayan sedimentado permanezcan en el matraz. Mientras el filtrado, se debe procurar que los embriones retenidos por el filtro estén en todo

momento rodeados de líquido puesto que, en caso contrario, se secan y se deshidratan (ver figura 6) (Grupo Prion, 2002).

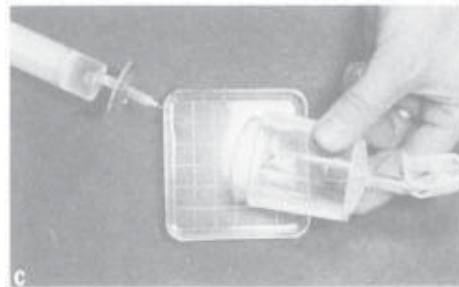
Figura 6. Filtración de los embriones.



Fuente: FAO, 1991.

Es por ello que los filtros de embriones constan de una pequeña sonda de silicona con la que se puede controlar el flujo de líquido que sale mediante una pinza mosquito. Una vez vertida toda la solución de recogida sobre el filtro y alcanzada la cantidad de medio deseada junto con los embriones, se vacía el contenido del filtro sobre una placa de búsqueda (con fondo cuadrículado) o de Petri en cuyo caso es conveniente efectuar el cuadrículado con algún tipo de marcador para facilitar la búsqueda (ver figura 7).

Figura 7. Recuperación de embriones.



Fuente: FAO, 1991.

Inmediatamente después se lava el filtro con una jeringa de 20 cc y una aguja fina utilizando el mismo medio de lavado a presión, para estar seguros de

que no quedan embriones atrapados en la malla o cubiertos con restos de mucosa o coágulos. Con este filtro que, al igual que el filtro de embriones, presenta un grosor de poro de 70 μm , se aspira el sobrenadante de la solución de recogida contenida en una probeta (FAO, 1991; Grupo Prion, 2002).

Para la búsqueda de los embriones se examina el volumen de solución restante bajo la lupa estereoscópica a 10 ó 20 aumentos y con luz difusa la búsqueda debe efectuarse de manera sistemática, cuadro tras cuadro, sin perder la orientación en el campo. Los embriones que se encuentren se aspiran con micropipetas; luego los embriones se pasan a una placa de Petri pequeña con medio de cultivo donde se van agrupando todos; se deben rotular las placas de Petri con nombres o números que correspondan al animal de procedencia para evitar errores al manipularlos posteriormente (Grupo Prion, 2002; McDonald, 1991).

2.9. DESARROLLO Y MORFOLOGÍA EMBRIONARIA

La fecundación marca el inicio del periodo embrionario caracterizado por una serie de divisiones celulares y la aparición de las primeras diferenciaciones, en los bovinos la primera división de segmentación tiene lugar entre 11 y 20 horas tras la fecundación, alcanzándose el estadio de 8 células entre 56 y 64 h después. A partir de la fase de 16 - 32 células (80-86h post-FIV), se establecen contactos entre los blastómeros y se estrechan las uniones entre las membranas plasmáticas de forma que las células no son visibles de forma individual: es el estadio de mórula compacta (Díez, 2003).

El embrión de bovino tiene un diámetro promedio de 150 a 190 micras. La zona pelucida tiene un grosor de 12 a 15 micras y esta compuesta de mucoproteínas. Su función es proteger y aislar para proporcionar un micro ambiente especial a la masa celular embrionaria. El espacio perivitelino es el hueco que existe entre la zona pelucida y la masa celular y es aquí donde se crea el microambiente especial para el embrión (FAO, 1991).

El trofoblasto esta constituido por células diferenciadas a planadas que van a dar origen a las membranas fetales del embrión. Los blastómeros son la unidad funcional del embrión, su número varía de acuerdo con el desarrollo embrionario (Orozco, 2002).

Los conocimientos básicos del desarrollo y morfología de los embriones en sus diferentes etapas, son indispensables para poder realizar la clasificación de los mismos, obteniendo así, a los mejores embriones.

2.10. CLASIFICACION DE LOS EMBRIONES

Bajo la lupa estereoscópica con haz de luz difusa, entre 40 y 60 aumentos, se examina el estado morfológico de los embriones y se clasifican según su calidad. Los embriones en perfecto estado desde el punto de vista morfológico se pasan a una placa de Petri pequeña con medio de cultivo recién filtrado y así se lavan 10 veces (para diluir posibles gérmenes), conservándose a temperatura ambiente hasta su transferencia o próxima manipulación (FAO, 1991; Grupo Prion, 2002).

Cada paso de lavado debe realizarse en una dilución 100 de la solución anterior y el transporte de los embriones de una placa a otra se debe realizar cada vez con micropipetas estériles. El lavado puede efectuarse en una misma placa mediante el pasaje de los embriones a través de gotas de medio (Grupo Prion, 2002).

Sólo se deben transferir aquellos embriones que se encuentran en un estadio de desarrollo correspondiente a su edad y de los que, basándose en sus características morfológicas, cabe esperar continúen su crecimiento. Los Ovocitos así como embriones totalmente degenerados, se deben rechazar inmediatamente. Los embriones/ovocitos recolectados por lavado el día 7 (día Cero se considera el día de la 1era inseminación), se clasificarán según su edad y estadio de desarrollo (ver cuadro 6) (Grupo Prion, 2002; FAO, 1991).

Cuadro 6. Clasificación de los embriones.

Clases	Descripciones
Clase 1	Calidad excelente. Embrión esférico, zona pelúcida intacta, cúmulo celular perfectamente estructurado con células del mismo tamaño color y textura.
Clase 2	Calidad buena. Embrión esférico o ligeramente elipsoidal, zona pelúcida intacta, algún blastómero suelto pero, por lo demás, cúmulo celular perfecto.
Clase 3	Calidad regular. Zona pelúcida intacta o dañada, blastómeros de diferentes tamaños, cúmulo celular con un 30 hasta un 60% de blastómeros intactos, ligero retraso del desarrollo (estadio de 32 células).
Clase 4	Calidad mala. Zona pelúcida intacta o dañada, blastómeros degenerados y sueltos en número considerable, cúmulo celular suelto y con menos del 30% de blastómeros intactos, desarrollo retardado con estadios embrionarios de blastómeros grandes (32, 16 células). Embrión degenerado. Zona pelúcida normalmente intacta, cúmulo celular con aspecto desorganizado y suelto, blastómeros de diferentes tamaños y pignóticos en muchos casos, estadios de desarrollo ya paralizado (2, 4, 8 hasta 16 células). Ovocito no dividido. Ovocito fertilizado o no, pero no dividido, rodeado de una Zona pelúcida intacta o no, perfectamente esférica.

Fuente: Cutini *et al*, 2001; Grupo Prion, 2002; De la Fuente, 2002; Hafez, 2002; Boggio, 2003.

2.11. CRIOPROTECTORES UTILIZADOS EN LA CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

Los crioprotectores son necesarios en la solución de congelación, ya que previenen el daño celular durante la congelación y descongelación, los cuales pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a su capacidad de atravesar la membrana plasmática de las células embrionarias (Boggio, 2003; Martínez *et al*, 2003; Mucci *et al*, 2004).

2.11.1. Crioprotectores penetrantes de bajo peso molecular (permeables o intracelulares): etilen-glicol (Pm=62.07), propanodiol (Pm=76.1), Dimetilsulfóxido (DMSO) (Pm=78.1) y glicerol (G) (Pm=92.1) (,1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes (Boiso, 2004; Boggio, 2003; Martínez *et al*, 2003; Celestinos *et al*, 2002).

La presencia de crioprotectores permeables es absolutamente necesaria, estos agentes reemplazan osmóticamente el agua intracelular de las células embrionarias antes del enfriamiento y en combinación con una velocidad de enfriamiento baja, reducen los cambios en el volumen de las células y minimizan la formación de cristales de hielo intracelular (Martínez *et al*, 2003).

2.11.2. Crioprotectores no penetrantes de bajo peso molecular: galactosa (Pm=180.2), glucosa (Pm= 181.1), sacarosa (Pm= 378.3) y trealosa (Pm= 3778.3) (Boiso, 2004; Martínez *et al*, 2003).

Los crioprotectores no permeables de bajo peso molecular favorecen la deshidratación de las células antes del enfriamiento, lo que resulta en una reducida formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación y previenen el choque osmótico, controlando la rehidratación intracelular, durante la descongelación. Sin embargo, estos crioprotectores deben ser combinados con crioprotectores permeables para proteger efectivamente las células durante la congelación (Boggio, 2003; Martínez *et al*, 2003).

2.11.3. Crioprotectores no penetrantes de alto peso molecular: (impermeables o extracelulares): Polivinilpirrolidona (PVP), Hialuronato de sodio y almidón hidroxietílico y polivinil alcohol (PVA) (Boggio, 2003; Martínez *et al*, 2003; Celestinos *et al*, 2002).

Los crioprotectores de alto peso molecular protegen a las células embrionarias durante la congelación y descongelación favoreciendo la formación de cristales de hielo de forma y tamaño inocuos. En la práctica actual la congelación de embriones por el método convencional de congelación o congelación lenta se realiza utilizando un único crioprotector, tal como el glicerol, etilenglicol o DMSO. Cuando se utilizan métodos de alta velocidad de congelación o cuando se emplea la técnica de vitrificación se suelen combinar dos crioprotectores en el medio de congelación, tales como glicerol/etilenglicol, glicerol/ propandiol, etilen glicol/DMSO en combinación con sacarosa, etc. La adición y eliminación de los crioprotectores puede realizarse en varias o en solo una etapa (Boggio, 2003; Martínez *et al*, 2003).

La permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa luego de la fecundación, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa. Esto se debe a la diferencia que existe en la relación área/volumen en un embrión en los primeros estadios del desarrollo (Boggio, 2003; Celestinos *et al*, 2002).

La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación en etilenglicol es la mórula compacta y blastocisto temprano de embriones producidos *in vivo* o *in vitro*, así como también se ha demostrado que embriones producidos *in vitro* tienen menor tolerancia a la congelación debido a la formación de hielo intracelular, aumento en la concentración de lípidos y enzimas que digieren la zona pelúcida, lo que los hace más sensibles al enfriamiento y a la invasión de virus, bacterias y hongos. Otro aspecto a considerar es la calidad de los embriones a vitrificar, ya que cuando se congelan embriones de buena calidad, se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular (Celestinos *et al*, 2002).

Está claro que la congelación de los embriones mamíferos varía con la especie del animal. Esta diferencia de especie está claramente establecida entre embriones bovinos, porcinos y equinos. Sin embargo trabajos recientes demuestran que embriones de bovinos, ovinos, ratones y conejos tienen un comportamiento similar a la congelación (Celestinos *et al*, 2002).

La importancia de las sustancias crioprotectoras se debe a su efecto de prevenir la deshidratación total causada por la congelación del agua extracelular, sustancias que no deben ser tóxicas y en el caso particular de los crioprotectores penetrantes deben atravesar la membrana plasmática rápidamente para no generar cambios de volumen celular por efecto osmótico.

2.12. CONSERVACION DE EMBRIONES

La criopreservación está influida por un elevado número de variables de forma que ninguna aproximación que contemple solo uno o parte de los aspectos implicados garantiza una eficiencia total (Díez, 2003; Mucci *et al*, 2004; De la Fuente, 2002). La eficacia de la transferencia embrionaria depende de mantener la viabilidad de los embriones desde el momento de recolección asta la transferencia o congelación. La principal ventaja de la criopreservación de embriones es que contiene el genoma completo (Munar *et al*, 2004; Díez, 2003; Arreseigor, 2003; Hafez, 2002).

Los principios básicos tienen como objetivo lograr una protección de las células frente a los principales efectos perjudiciales del proceso, como son: formación de hielo intracelular, deshidratación y efectos tóxicos de los crioprotectores (Díez, 2003).

2.12.1. Congelación de embriones

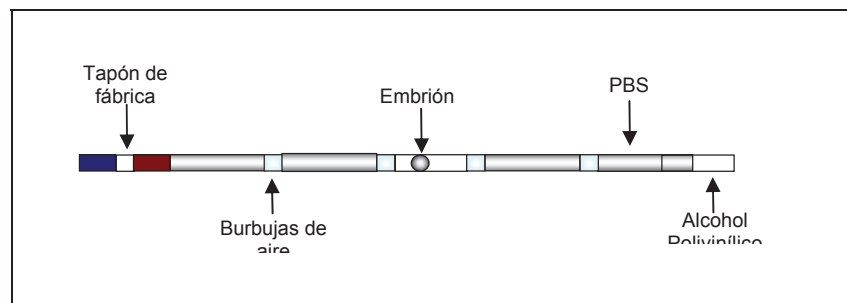
2.12.1.1. Exposición de los embriones a las soluciones de congelación. La exposición de los embriones a la solución de crioprotectores

empleada es de 15-25 min. Estas están compuestas principalmente por una solución salina tamponada fosfato (PBS) suplementada con suero o albúmina, a las cuales se les adicionan sustancias denominadas crioprotectoras, que modifican el comportamiento físico de la solución y protegen las células de los daños asociados el descenso térmico. En esta metodología se utilizan en concentraciones que no superan 2 Moles (M) (Martínez *et al*, 2004; Mucci *et al*, 2004; Boggio, 2003; Díez, 2003).

2.12.1.2. Envasado de los embriones. Actualmente el elemento más empleado para conservar los embriones, tanto para la criopreservación como para el transporte y/o transferencia a un animal receptor, lo constituye la pajuela de plástico de 0.25 ml de capacidad. Para cargar las pajuelas, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0.5 a 2 centímetros de solución de congelación separados de otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa (Mucci *et al*, 2004; Boggio, 2003).

2.12.1.3. Enfriamiento inicial. Se efectúa mediante la introducción de los embriones envasados en la criocámara de una máquina congeladora programable. Así, la muestra se enfría desde la temperatura de equilibrio hasta alrededor de -7°C (Martínez *et al*, 2004; Mucci *et al*, 2004; Boiso, 1991).

Figura 10. Envasado de embrión en pajuela.



Fuente: Mucci *et al*, 2004.

2.12.1.4. Inducción de la cristalización. Este se efectúa luego de 5 - 7 minutos de introducidas las pajuelas en la criocámara, tocando el extremo de las

pajuelas con un elemento metálico enfriado en N₂ líquido. Con este procedimiento se evita un sobreenfriamiento excesivo de la solución y se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación del calor latente de cambio de estado (Mucci *et al*, 2004; Boggio *et al*, 2003).

2.12.1.5. Descenso térmico lento y controlado. El descenso térmico se efectúa utilizando máquinas congeladoras programables, desde la temperatura en la cual se efectúa el seeding hasta -30 a -40°C, y a tasas que comprendidas entre -0,3 a -0,5°C/minuto. Se logra una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización del embrión y del medio que inmediatamente lo rodea (Martínez *et al*, 2004; Mucci *et al*, 2004; Boiso, 1991).

2.12.1.6. Descenso térmico rápido. Alcanzada la temperatura de -30 a -40°C las pajuelas se introducen directamente en N₂ líquido. El descenso térmico lento una formación controlada de cristales de hielo, generando una concentración y finalmente vitrificación del embrión y del medio que inmediatamente lo rodea.

2.12.1.7. Almacenamiento en N₂ líquido. Se efectúa en contenedores (termos) de N₂ líquido a -196°C (Mucci *et al*, 2004).

2.12.1.8. Descongelación. Este procedimiento debe realizarse de manera rápida para impedir el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación. El descongelamiento lento otorga el tiempo suficiente como para permitir la desvitrificación extra e intracitoplasmática lo que puede conducir a una baja sobrevivencia poscriopreservación. Para la descongelación, las pajuelas son retiradas del N₂ líquido e introducidas en un baño María a temperaturas que rondan los 30° C.

2.12.1.9. Extracción de los crioprotectores. Luego de la congelación-descongelación, la mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones antes de ser transferidos a receptoras o puestos en cultivo. Se recurre a la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crioprotector utilizado. Otra

alternativa es utilizar sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante (Mucci *et al*, 2004; Boggio, 2003).

2.12.2. Vitrificación de embriones

2.12.2.1. Exposición de los embriones a las soluciones de vitrificación.

Las soluciones están formuladas con una combinación de crioprotectores, un soporte líquido (PBS o medios enriquecidos) y macromoléculas (suero, BSA). Estas soluciones se caracterizan por contener concentraciones de agentes crioprotectores (5 a 7 M) (Mucci *et al*, 2004; Díez, 2003).

2.12.2.2. Envasado de los embriones en recipientes apropiados y en pequeños volúmenes. Se utilizan pajuelas de 0.25 ml de capacidad. La conservación de ovocitos y embriones en pequeños volúmenes, se han utilizado exitosamente gradillas de microscopia electrónica, pajuelas de 0.25 ml abiertas y estiradas, así como las espirales de nylon y capilares de vidrio. Otro método es descargando los embriones suspendidos en una gota de solución de vitrificación directamente en N₂ líquido, sin usar ninguno de los elementos de contención descritos anteriormente.

2.12.2.3. Descenso ultrarrápido de la temperatura (vitrificación). La introducción de las pajuelas de 0.25 ml contenido soluciones de vitrificación en N₂ líquido permite alcanzar tasas de descenso térmico del orden de los 2.500° C/minuto (Martínez *et al*, 2003).

2.12.2.4. Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológicas. El agua vitrificada mantiene la misma distribución iónica y molecular que en estado líquido, por lo cual, si al calentar la muestra el movimiento molecular que en estado líquido no se recupera rápidamente, existe el riesgo que se establezcan los procesos de nucleación homogénea o heterogénea, así como de crecimiento a partir de pequeños núcleos formados durante la vitrificación.

Durante el calentamiento, se necesita alcanzar altas tasas de ascenso térmico. Estas tasas se logran introduciendo la pajuela en un baño maría a 20° C o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39° C durante pocos segundos (Mucci *et al*, 2004).

2.12.2.5. Extracción de los crioprotectores. Una vez calentadas las pajuelas, los crioprotectores intracelulares deben ser retirados de los embriones, e inmediatamente, estos deben rehidratarse. La utilización del buffer (sacarosa), puede o no estar contenido en la misma pajuela (Mucci *et al*, 2004; Díez, 2003).

2.13. FACTORES QUE DETERMINAN EL RESULTADO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS

Está demostrado que los resultados de preñez dependen no sólo de cada factor embrionario, sino de la interacción que pueda existir entre dos o más de ellos (Díez, 2003; Cutini *et al*; 2002; Hafez, 2002).

2.13.1. Calidad embrionaria. La realización de una minuciosa evaluación de la calidad embrionaria es de fundamental importancia para el éxito de la transferencia. La calidad embrionaria puede determinar los resultados obtenidos, pero otros factores relacionados con la receptora o con la transferencia podrían modificar dichos resultados (Boggio, 2003; Cutini *et al*, 2002).

Actualmente se utiliza la escala propuesta por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria que agrupa los embriones según su calidad en 4 grados: excelentes, buenos, regulares, malos o degenerados (Cutini *et al*; 2002).

2.13.2. Estadio de desarrollo. Los porcentajes de preñez para embriones frescos producidos *in vivo* y transferidos en estadio de mórula han sido muy variables oscilando entre 48 y 70% (Díez, 2003; Cutini *et al*, 2002).

Para embriones producidos *in vitro*, los mayores porcentajes de preñez (60%) resultaron con blastocistos tempranos, blastocistos y blastocistos protruidos de 7 días de edad, que a su vez fueron significativamente mayores para los mismos estadios pero para una edad de 8 días, lo cual estaría indicando que la edad embrionaria sería lo determinante del éxito de la transferencia y no el estadio en sí (Cutini *et al*, 2002; Hafez, 2002).

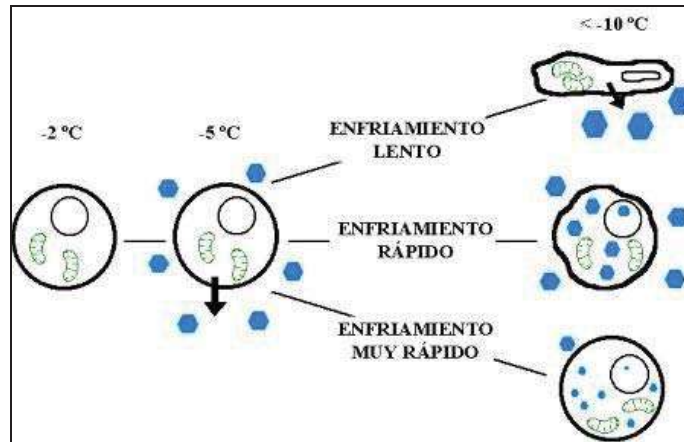
2.13.3. Edad embrionaria. La mayoría de los embriones bovinos son colectados y transferidos con una edad de 6 a 8 días y no queda claro si realmente hay un efecto de la edad en días o del estadio de desarrollo. La transferencia de embriones de 9 días o más no se realiza, pues es difícil encontrar los embriones en el medio de lavado luego de los mismos han perdido la zona pelúcida. Los embriones que sufren la segmentación más rápidamente tienen una capacidad de desarrollo superior en términos de formación de morula-blastocisto. (Boggio, 2003; Díez, 2003; Cutini *et al*, 2000; Hafez, 2002).

Los resultados de preñez luego de transferir embriones frescos producidos *in vitro*, de día 6 ó 7 no mostraron diferencias significativas, con valores de preñez al día 40 de gestación de 78 y 68% respectivamente (Cutini *et al*, 2002).

2.13.4. Criopreservación. El efecto de la criopreservación de los embriones sobre los resultados de preñez es muy variado y ello se debe a que se producen interacciones con otros factores tales como la edad embrionaria, la calidad embrionaria y el estadio de desarrollo y a su vez si los mismos han sido producidos *in vivo* o *in vitro*. Aquellos embriones que sufren su primera segmentación 26 a 36 h post FIV, alcanzan el estado blastocistos más rápidamente que los que se segmentan de forma más tardía (36-48h) (ver figura 8) (Diez, 2003; Boggie; 2004; Cutini *et al*, 2000).

Las bajas temperaturas a las que son sometidos los embriones así como las altas concentraciones de crioprotectores utilizadas podrían ser la causa de la disminución en la viabilidad de estos embriones (Cutini *et al*, 2002).

Figura 8. Esquema de los eventos físicos ocurridos en el congelamiento. (Hexágonos representan cristales de hielo de diferente tamaño según la velocidad de enfriamiento).



Fuente: Boggio, 2003.

2.13.5. Micromanipulación. Los embriones bovinos son micromanipulados con el fin de obtener algunas células y proceder a la identificación del sexo previo a su transferencia o para ser divididos en dos partes iguales (hemiembriones) y producir mellizos idénticos, lo que permite la disponibilidad de animales idénticos en los programas de transferencia embrionaria (Boggio, 2003; Cutini *et al*, 2002).

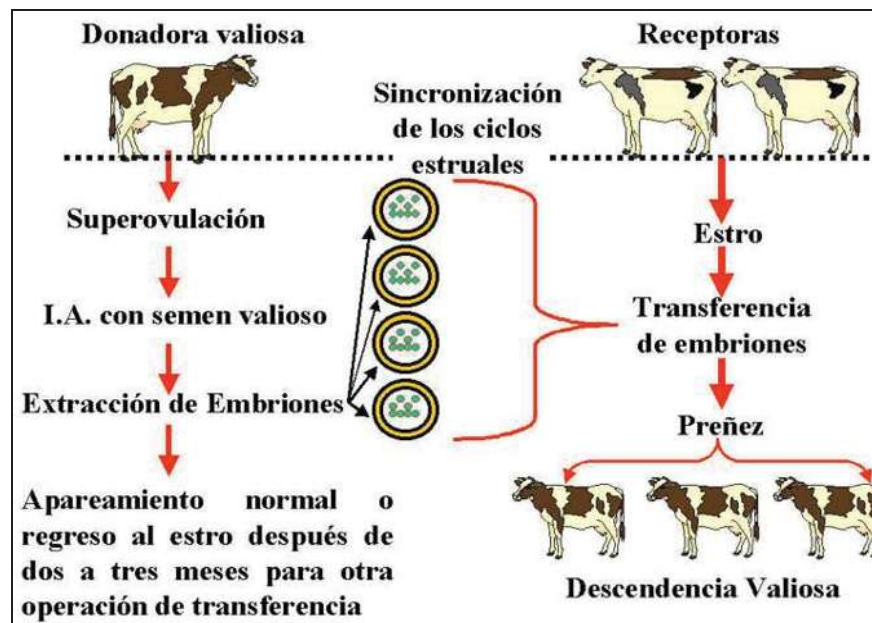
Los porcentajes de preñez obtenidos luego de la transferencia de los embriones micromanipulados generalmente no superan el 30%, siendo a su vez muy variables según las condiciones de cultivo utilizadas, la calidad embrionaria así como el protocolo de congelación empleado (Cutini *et al*, 2002).

2.14. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Está técnica, también conocida como Transplante de embriones (TE), consiste en el proceso de colección de embriones de una madre biológica o genética (llamada donadora) y la colocación de los mismos en el útero de madres adoptivas (llamadas receptoras), en las que se lleva a término la gestación (ver

figura 9) (Arreseigor, 2003; Grupo Prion, 2002; Di-Bella, 2001; Romo, 1993; McDonald, 1991).

Figura 9. Esquema sintetizado del procedimiento de la transferencia de embriones.



Fuente: Grupo Prion, 2002.

Existen muchas aplicaciones de la transferencia embrionaria en bovinos; entre las más comunes están:

1. aumentar la cantidad de crías de hembras con características genéticamente deseables para su conservación.
2. reproducir donadoras que físicamente no pueden por presentar problemas reproductivos.
3. optimizar el uso de semen de valor genético.
4. transportar material genético con facilidad a través de grandes distancias y fronteras.
5. ayudar en la aclimatización de ciertas razas a diversos ambientes.
6. desarrollar un hato de manera rápida.
7. controlar la transmisión de enfermedades.

8. facilitar la comercialización de material genético.
9. diagnosticar fallas reproductivas en vacas donadoras.
10. auxiliar en pruebas de progenie.

(Arreseigor, 2003; Romo, 1993; McDonald, 1991)

2.15. LIMPIEZA Y ESTERILIZACION DEL MATERIAL DEL LABORATORIO.

En este apartado del trabajo se explican las técnicas en general del tratamiento que se le debe de dar al material de laboratorio, actualmente algunas de las piezas son desechables.

La eliminación de residuos de materia orgánica e inorgánica de los materiales de cristal, metal y plástico es con agua corriente a presión sobre su superficie, posteriormente se procede al cepillado enérgico para que al aplicar el detergente en el material, no se reduzca su efecto bactericida. La malla de los filtros sólo debe enjuagarse con agua a presión (Del Castillo *et al*, 2000; Austin *et al*, 1998).

2.15. Inmersión del material de laboratorio. Antes de enjuagarse el material de cristalería, metálico y plástico debe sumergirse en agua corriente, destilada o bidestilada con detergente enzimático, el más recomendado es el Extrán alcalino o ácido por la baja toxicidad de sus residuos y su fácil eliminación con agua corriente a presión y cepillado enérgico (FAO, 1991).

La concentración de Extrán alcalino o ácido por la baja toxicidad de sus residuos y su fácil eliminación con agua corriente a presión con la suciedad y volumen del material. El material debe permanece en el detergente 2 horas como mínimo y 24 a 36 horas como máximo. La potencia del detergente aumenta cuando se somete a ebullición (Austin *et al*, 1982).

2.15.2. Enjuague del material limpio. Al mismo tiempo que se vierte agua corriente a presión sobre la superficie del material de vidrio se talla energéticamente para quitar los residuos del detergente. En el caso de las sondas, estas se conectan directamente a la llave del agua, haciendo correr el agua durante 30 a 60 minutos. Los filtros se enjuagan con agua a presión agitándolas de manera energética, no deben tallarse, pues se pudieran romper (Proyecto Vigía, 2004).

2.15.3. Ultimo enjuague. Para eliminar los minerales del agua corriente, se recomienda enjuagar el material de 8 a 10 veces con agua desionizada. Una vez enjuagado, el material se pone a escurrir boca abajo, para evitar con ello la penetración de polvo (Austin *et al*, 1982).

2.15.4. Secado del material. Este se realiza en una estufa bacteriológica, un horno Pasteur o un secador para material, a una temperatura de 35 a 40°C por 30 minutos a 1 hora, evitando que permanezca más tiempo, ya que se puede ver afectada la naturaleza del material (Proyecto Vigía, 2004).

2.15.5. Empacado del material. Una técnica adecuada de empaque permite la protección, identificación, mantenimiento de esterilidad, y transporte del usuario, facilitando la apertura, transferencia con técnica aséptica lo cual permite una utilización segura.

Para empacar los cubrebocas, Sondas, jeringas desechables, tapones de hule, material metálico, filtros con su membrana o tamiz de 0.22 ò 0.45 micras; se utilizan bolsas de papel universal Kraff. En el caso de los filtros y su membrana, se deja un poco abierto para que el vapor de agua pueda circular y no quemé las membranas (Proyecto Vigía, 2004).

El material de cristal con tapón de rosca, también se deja abierto media vuelta para que circule el aire caliente dentro del material, estos deberán cerrarse inmediatamente después de sacarlos de la autoclave. Cuando se esteriliza por rayos gamma se emplean bolsas de plásticos adecuadas al tamaño del material,

después de empacarlo se cierran las bolsas con un sellador eléctrico. Posteriormente se esterilizan (Austin *et al*, 1982).

2.15.5.1. Técnica o procedimiento:

- Posicionar el material diagonalmente en el centro del empaque.
- Colocar el indicador o integrador químico interno en el centro del paquete.
- Doblar la punta orientada a la persona que está preparando, de tal manera que llegue al centro del paquete cubriendo el artículo y realizar una doblez con la punta hacia fuera.
- Doblar los laterales hacia el centro del paquete en forma de sobre, siempre haciendo un doblez en la punta. Realizar el mismo procedimiento en el otro lado de modo que ambas cubran el artículo.
- Completar el paquete levantando la cuarta y última punta hacia el centro del paquete, marcar con cinta indicadora de proceso envolviendo todo el paquete, no se debe poner menos de 5 cm (Proyecto Vigía, 2004).

2.15.5.2. Tamaño del paquete.

Autoclave: el tamaño de los paquetes no deberá medir más de 25 x 25 x 40 cm. De este modo, es posible disminuir el tiempo de exposición y de secado. En cuanto su peso, ellos no deben sobrepasar los 5 Kg (Del Castillo *et al*, 2000).

Calor seco: se recomienda utilizar cajas metálicas con no más de 30 piezas de instrumental. Así mismo, no es recomendable utilizar cajas de aluminio común ya que este material, a altas temperatura, puede desprender partículas de aluminio sobre el instrumental (Proyecto Vigía, 2004; Comité Estatal, 1997).

2.15.5.3. Sellado. La finalidad del sellado hermético y rotulado es mantener la esterilidad del contenido de los paquetes antes y en el momento de uso.

2.15.5.4. Identificación del paquete. Su finalidad es permitir la identificación de la carga y posibilitar el rastreo de los paquetes esterilizados en

caso de problemas de tipo técnico con el equipamiento o evento infeccioso atribuido a la falla del proceso de esterilización. Se pueden utilizar para ello, etiquetas adhesivas o cinta adhesiva (masking tape). Código de barras o una etiquetadora manual (Proyecto Vigía, 2004).

2.15.6. Métodos de esterilización. Se recomienda el uso de material desechable, en jeringas, agujas, placas de Petri, filtros de esterilización, tubuladuras de vías de entrada y salida del líquido de colecta, envases de medios de cultivos y criopreservación. Antes de la esterilización, todo el material de acero, vidrio, plástico o siliconas deberá ser lavado con solución de jabón detergente neutro y luego enjuagado a través de 5 a 10 cambios en agua destilada para remover residuos de detergente y otras impurezas (Munar, 2003; Comité Estatal, 1997).

Los autores Carbone y Castillo, coinciden en la utilización de los métodos de esterilización, los cuales se pueden resumir en el cuadro 1.

Cuadro 7. Procedimientos para la esterilización.

	FISICOS	QUÍMICOS
CALOR HUMEDO	Ebullición de agua Vapor a presión (autoclave)	Soluciones concentradas de derivados de cloruro de amonio.
CALOR SECO	Horno	Soluciones derivadas del benzal (cloruro de benzalconio)
RADIACIONES	Ionizantes (rayos alfa, beta, gamma, delta y equis) No ionizantes (rayos infrarrojos, ultravioleta y microondas)	

Fuente: Carbone, 2003; Del Castillo *et al*, 2000.

2.15.6.1. Método de esterilización calor húmedo. Es el método más rápido y eficiente, se emplea para el instrumental, ropa y la mayoría de los medios de cultivo. Para utilizarlo hay que seguir los siguientes pasos:

- Colocar agua en el fondo de un recipiente
- Colocar los objetos que se van a esterilizar

- Cerrar perfectamente el aparato
- Abrir la válvula de presión
- Esperar a alcanzar la presión
- Aplicar el calor
- Esperar que hierva y que el aire sea reemplazado por vapor
- Cerrar la válvula de presión
- Esperar a alcanzar la presión deseada 15 lb. A esta presión durante 15-20 min., todas las formas bacterianas mueren.
- Una vez completa la esterilización, se disminuye poco a poco la presión, abriendo lentamente la válvula; ya que si se abriera súbitamente se producirá ebullición de los líquidos contenidos en los tubos y matraces con la siguiente expulsión de tapones (Joklik *et al*, 1994).

2.15.6.2. Esterilización a vapor. La esterilización a vapor es el procedimiento de esterilización más común y es el método de preferencia excepto para los materiales que no pueden resistir el calor y la humedad creada por el proceso. El equipo a utilizarse se denomina autoclave. El mecanismo de acción del calor húmedo es la desnaturalización de las proteínas. La autoclave tiene la ventaja de producir un elevamiento de temperatura en forma rápida, con cortos tiempos de esterilización sin dejar residuos tóxicos en el material (Carbone, 2003; Proyecto Vigía, 2004; Joklik *et al*, 1994).

2.15.6.3. Esterilización por calor seco. Para material de vidrio y acero inoxidable, se puede utilizar una autoclave (durante 30 a 45 minutos a 121° C), o calor seco en estufa a 150° C durante 1 o 2 horas. Para mantener la esterilidad durante la conservación, se utilizan diferentes materiales de empaques con las indicaciones del contenido (Munar, 2004; Proyecto Vigía, 2004).

Es importante señalar que el tiempo de exposición debe ser contabilizado después que se ha alcanzado la temperatura requerida y no desde la carga del esterilizador porque puede requerirse un tiempo prolongado para alcanzar la temperatura de esterilización.

2.15.6.4. Radiación Gamma. Es el método más confiable de esterilización, no deja residuos tóxicos por lo que no requiere de aireación ni cuarentena. La desventaja de la radiación es que produce cambios estructurales en algunos materiales, especialmente polímeros, causando fluctuaciones en su densidad y aumento de su fragilidad. Estos cambios dependen de las dosis y son acumulativos. Algunas compañías de esterilización tienen información del número de ciclos de irradiación que cada material puede soportar (sondas, jeringas, frascos y cápsulas de cultivo, catéteres, tubuladuras, filtros). Puede ser una alternativa atractiva al uso del EtO, y dependiendo del volumen de material a esterilizar puede ser aun más económico (Comité Estatal, 1997).

2.15.6.5. Uso de antisépticos y desinfectantes. Para esterilizar a temperatura ambiente pueden utilizarse soluciones de amonio cuaternario o alcohol 70%. Se aplica sobre material o superficies que no están en contacto con embriones, luego son enjuagados con solución fisiológica estéril, en caso del alcohol 70%, no es necesario enjuagar. Este sistema es utilizado sobre instrumental delicado (g. ecógrafo) y accesorios (g., vaginoscopios, dilatadores cervicales, estiletes y sondas) (Munar, 2004; Del Castillo *et al*, 2000).

2.16. INSTALACIONES

Para realizar las técnicas de laboratorio en la transferencia embrionaria, se debe contar con las instalaciones, mobiliario, equipo, material y reactivos que ofrezcan seguridad, funcionalidad e higiene.

Trampa. Una trampa de aire evita las corrientes de aire directas que causan contaminación.

Pisos y paredes. Es preferible que los cuartos tengan pisos y paredes lisas y sin esquinas para que no guarden polvo o suciedad.

Puertas. Las puertas deben cerrar herméticamente para evitar corrientes de aire que preparen los medios o desarrollen otras técnicas.

Mesas de trabajo. Las mesas para búsqueda, evaluación, congelación, descongelación de embriones y preparación de medios, deben estar cubiertas con formica blanca o acero inoxidable, y alejadas de las ventanas para evitar que la luz solar directa dañe a los embriones.

Instalación de gas

Instalación eléctrica

2.16.1. Área de elaboración de medios

Equipo

Campana de flujo laminar

Báscula analítica o granataria de precisión

Baño de María

Material

Filtros de 0.22 ó 0.45 micras

Frascos de 500 y 1000 ml. Estériles

Probetas de vidrio Pirex de 500 y 1000 ml estériles

Matraces de vidrio Pirex de 500 y 1000 ml estériles

Substancias y reactivos

Agua bidestilada o tridestilada estéril

Suero Fetal Bovino o Albúmina Serica Bovina

Sacarosa

Glicerol

Sulfato de Estreptomicina

Penicilina G Sódica

2.16.2. Área de obtención de embriones. En esta área, el equipo de recolección de embriones debe llevar un registro de todas las actividades, consideradas durante, por lo menos, los 2 años consecutivos a la exportación de

los embriones para presentarlo a la autoridad encargada de la autorización en caso de inspección (OIE, 2004).

Equipo

Jaula con sombra para la donadora gestante

Material

Manguera

Filtro

Sonda de calibre FR 16, 18, 20, 22

Estilete o mandril para sondas

Dilatador cervical metálico

Adaptadores para jeringas de 20 ml para poder inflar los globos de las sondas.

A continuación se muestran fotos del material de laboratorio utilizados en el proceso de la TE, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Nicolás Mucci (2004).

Figura 10. Catéteres flexibles de 2 vías, 16 y 18G.



Figura 11. Catéter flexible de 2 vías, armado con una sonda.

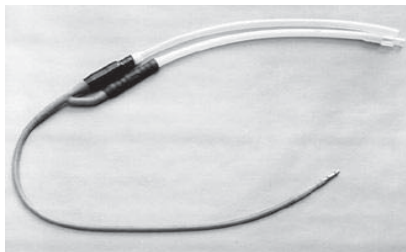


Figura 12. Punta Metálica de un catéter Flexible. Antes del lavaje debe controlarse la integridad de Balón.

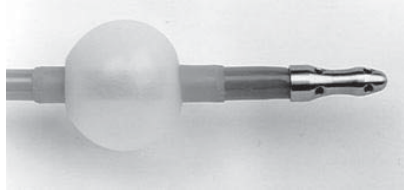


Figura 13. Catéter de 2 vías con punta metálica.



Figura 14. Filtro.



Substancias y reactivos

Agua para lavar la porción posterior de la donadora

Medio Dulbecco fosfato modificado (PBS), adicionado con 0.4% de Albúmina Serica Bovina (ASB) ó 1% de suero fetal inactivado

Prostaglandinas o análogos.

Lidocaína al 3%

2.16.3. Área de búsqueda y evaluación. El área de manipulación es un local en el que los ovocitos extraídos de los ovarios son maduros y fecundados y en el que los embriones son después cultivos *in vitro*. Puede estar situado en las cercanías del lugar de extracción de los ovocitos o estar alejado del mismo.

En el área de evaluación, los embriones producidos también pueden ser sometidos a cualquier tratamiento necesario, como el lavado, antes de ser congelados, conservados y aislados en cuarentena (OIE, 2003).

Material

Jeringas de 20 ml automáticas o desechables con aguja de 22 x 32 para el lavado de los filtros.

Cajas de Petri de plásticos cuadrículadas, desechables y estériles de 100x 15 mm para la búsqueda de embriones

Cajas de Petri de plásticos desechables de 35 x 10 mm que sirven para reunir a los embriones de la caja de búsqueda.

Cajas de Petri de plástico desechables estériles de 100 x 15 mm no ralladas para lavar a los embriones.

Equipo

Microscopio estereoscópico con aumento de 10 a 112 x para realizar la búsqueda embrionaria y de 40 a 50 x para realizar la evaluación de los embriones.

Substancias y reactivos

Medios de PBS sin albúmina o suero fetal bovino para lavar los filtros (Hafez; 2002).

2.16.4. Área de congelación embrionaria

Material

Pajillas francesas de 0.25 ml estériles

Bastones y Gobelet's

Equipo

Microscopio Esteroscopio microscopio invertido con un lente de 300 a 400 x. se pueden utilizar microscopios con una menor potencia, dependiendo de la experiencia y habilidad del técnico evaluador.

Congelador manual o automático de embriones

Termo con nitrógeno líquido con capacidad de 18 a 32 Kg

Sellador eléctrico de pajillas

Substancias y reactivos

Medio para congelar embriones, PBS más 10% de glicerol

Nitrógeno líquido

(OIE, 2003)

2.16.5. Área de descongelación embrionaria

Material

Aplicador de embriones

Fundas para la transferencia o para inseminación

Caja de 4 pozos, con capacidad de 2.5 mlc/u

Estériles para pajillas

Pajillas francesas estériles de 0.25 ml

Equipo

Microscopio estereoscópico

Microscopio invertido

Substancias y reactivos

Medios para descongelar embriones

Lo ideal para un laboratorio de TE, es contar con todas las áreas anteriormente mencionadas, sin embargo se puede trabajar compartiendo algunas de las áreas, cuidando ante todo la esterilidad del ambiente y la de los materiales con los que se va a trabajar, poniendo cuidado especial cuando se trate en la manipulación de los embriones, para lograr un mayor porcentaje de nacimientos.

2.16.6. Material y sustancias utilizadas en general

Tijeras de cirujano

Pinzas Nelly

Pinzas de disección jeringas de 5 y 20 ml

Jeringas para insulina

Agujas hipodérmicas de 20 x 32G

Termómetro de laboratorio de -40°C a 150°C

Cronómetro

Bulbos de látex para las pipetas de Pasteur

Pipetas de Pasteur con punta redondeada con una abertura de 250 a 400 micras

Pinza

Termo cafetero de 1 litro

Gasa

Parafilm

Papel absorbente

Cinta adhesiva (masking tape)

Marcador indeleble de punto fino

Substancias y reactivos

Picetas con alcohol al 70%, agua bidestilada y cloruro de benzalconio.

(Mucci, 2004)

CONCLUSIONES

La Transferencia de embriones (TE) es una biotecnología, que facilita la reproducción de animales con ciertas características y un mejor control de ciertas enfermedades, en los mamíferos en los que se aplica.

En los programas de TE se emplean donantes de alto merito genético para la producción de leche o de carne.

Las hembras donadoras se someten a tratamientos hormonales para su superovulación, para ser posteriormente inseminar artificialmente con semen congelado o fresco de toro de excelente calidad, entre el día 6 y 8 post inseminación.

Una hembra donadora puede ser superovulada de 3 a 4 veces al año, obteniendo un mayor número de crías, o utilizar la criopreservación para su posterior transferencia.

Las hembras receptoras pueden ser de baja calidad genética, por lo cual se disminuyen los costos.

El éxito de la TE involucra los procesos de selección de donadora y receptora, superovulación, sincronización de celos, preparación de medios de cultivo, métodos de obtención de embriones, asilamiento y clasificación de embriones, crioprotector utilizado en la congelación embrionaria, criopreservacion y descongelación de los embriones, asta la obtención de las crías.

L I T E R A T U R A C O N S U L T A D A

Aggen, L. H. Practical embryo Transfer, Bov Prac, 22: 58-59. 1987.

Armada, R. J.; Ramírez, M. H.; Rentería, F. J. y Porras, A. A. Uso del suero de terneras irradiado con cobalto 60 en cultivos celulares primarios de embriones de pollo y embriones de pato. Memorias de la Reunión de Investigación pecuaria en México, 1985.

Arreseigor, C. J. "Transferencia embrionaria en bovinos" [en línea]. Revista el productor. 1 de junio 2003.

<http://www.revistaelproductor.com/junio2003/transferencia.htm> [Consulta: 24 mayo, 2004].

Astiazaran, J. R.; Tijeraza S. y Longoria R. J. 1987. Porcentajes de gestión con embriones de bovinos de buena y pobre calidad colectados y transferidos con solución Arman modificada. Memorias de la Reunión de investigación Pecuaria en México, México. 1987.

Austin, C. R. and Short R. V. Desarrollo Embrionario y Fetal. 2 ed., La Prensa Medica Mexicana, México D. F., 1982.

Barrios, A. y Diego, R. "Transplante de embriones en fincas lecheras: producción de toros reproductores y hembras de reemplazo" [en línea]. Revista Venezuela Bovina. 24 de Mayo 2002. Artículos Libres - Edición No. 52 - Página 85. <http://www.pcca.com.ve/vb/index.html> [Consulta: 24 mayo, 2004].

Bó, G. A. y Mapletotf, R. J. "Control de desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones". [en línea] Producción Bovina de Carne. Republica Argentina. Taurus, 1 (4):14-27. http://www.produccionbovina.com/información_tecnica/transplante_embionario/01-control.htm. [Consulta: 18 de Septiembre, 2004]

Boggio, D. J. 2003. Transferencia de embriones y biotecnología. Avances. Capitulo 8. Universidad de la republica Uruguay. <http://www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle&artd=169> [Consulta: 23 agosto, 2004].

Bosio, I. "Principios básicos de criobiología". [en línea] Institut Dexeus. Barcelona. 15 de octubre 2004. <http://www.asebir.com/congreso/programa/criobiologia.doc> [Consulta: 15 Octubre, 2004].

Carbone, N. ¿Qué y cómo esterilizar?. [en línea] Esterilizar. Com. Buenos Aires, Argentina. 24 de Julio 2003. <http://www.estilizar.com/esterlizar.php?p=> [Consulta: 15 Octubre, 2004].

Celestinos, M y Gatica, R. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch. med. vet.* [online]. 2002, vol.34, no.2 [consulta: 24 Mayo 2004], p.157-165. Disponible en la World Wide Web: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000200002&lng=es&nrm=iso. ISSN 0301-732X.

Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Michoacán de Ocampo. S. C. Manual de Técnicas de Diagnostico Bacteriológico. Octubre de 1997. Pp. 3

Cutini, A.; Teruel, M. y Cabodevilla, J. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos [en línea] *Taurus*, 2(7):28-39
http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/transplante_embionario/02-factores.htm [Consulta: 24 mayo, 2004].

De La Fuente, J. 2002. Manipulación de Embriones en Ganado Vacuno. Universidad de Extremadura, Caceres, Facultad de Veterinaria. Pp. 51 - 61.

Del Castillo, C. E.; Gómez A. F. Asepsia. Manual de laboratorio. Practicas de Virología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México, 2000. Pp. 2 - 4.

De Luca, L. "Método One Step de Crioconservación Embrionaria" [en línea]. Producción Bovina de Carne. http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/transplante_embionario/07-onestip [Consulta: 24 mayo, 2004].

Di-Vella, R. V. 2001. "Utilización de la Transferencia de embriones en México" [en línea]. <http://www.ganaderia.com.mx/articulos/ia/ia001.php>. [Consulta: 3 Enero, 2005].

Díez, M. C. "Congelación de Embriones Bovinos producidos in Vitro" [en línea]. En: Su Portal Veterinaria. <http://www.portalveterinaria.com/print.php?artd=226> [Consulta: 27 Junio, 2004].

Domínguez, M. M.; Singh, J.; Adams, G. P. 2002. "Recolección y transferencia folicular de ovocitos en bovinos". University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá. XXXVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Puebla.

Fernández, A. Ondas Foliculares en bovinos. Su importancia en al sincronizacion de celos [en línea] Portal Veterinaria. 3 de Enero del 2003. <http://www.portalveterinaria.com/modules.php?name=Articles&file=article&sid=157> . [Consulta: 27 Agosto, 2004].

Fuentes, A.; Papayas. C.; Ugarte y de la Fuente, J. 1992. Selección de donantes y receptoras dentro de un programa de T. E bovina. Madrid. Aberekin. SA. Barrio Arteaga n. 25. Derio-Vizcaya. Producción animal. CIT-inia. Aptdo. 8111.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome, © FAO 1991.

Grupo Prión. 2002. La Clonación y la Transferencia de Embriones en Vacunos de Leche [en línea] Lima - Perú Junio del 2002. <http://www.visionveterinaria.com/prion/EVPRION.htm> [Consulta: 24 mayo, 2004].

Hafez, E. S. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 415 - 439; 441 - 470.

Joklik; Willett; Amos; Wilfert; Zinsser. Microbiología. 20a. Ed. 1994. Editorial Médica Panamericana. Imperio en la Argentina. Pp. 277 - 282.

Martínez, E. A.; Vázquez J. M; Roca J; Cuello C.; Parrilla I. y Gil, M. A.; Congelación de Embriones Porcinos. Departamento De Medicina y Cirugía Animal (reproducción y Obstetricia) Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 30071] Murcia. En línea [consulta: 24 Mayo, 2004].

Mapletoft, R. J.; Bo G. A; y Del Campo M. R. 2002. Factores que afectan la superovulación en la vaca: consideraciones prácticas. Dpto. of Medicine and Theriogenology Western Collage of Saskatchewan, Saskatoon. Pp. 31- 45.

Mazzucchelli, F.; Mayenco A. y Raga J. Terapia hormonal en el manejo de la reproducción y en la resolución de problemas reproductivos en ganado vacuno. [en línea] Facultad de Medicina Veterinaria en Madrid. <http://www.redvya.com/veterinarios/veterinarios/especialidades/bovino/Especialista/Articulo17.htm> [Consulta: 24 Mayo, 2004].

McDonald, L. E. 1991. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. México, DF. 512 - 514; 519 – 530.

Mucci, N.; Cabovidevila J.; Kaiser G.; Hozbor F.; Alberio R. 2004. Criopreservación de embriones bovinos producidos *in Vitro*. Grupo Biotecnología de la Reproducción. INTA Balcarce, Argentina. Pp. 1-10.

Munar y Asociados. 2002. Transferencias de embrionarias. [en línea] <http://www.munar.con.ar/trnasemb.htm> [Consulta: 27 Junio; 2004]

Munar, C. J. 2004. Dos décadas de transferencia en Bovinos y nuevas Biotecnologías disponibles para el futuro. Parte III. <http://www.munar.com.ar/recursos/DosTEPS.pdf> [Consulta: 23 Agosto, 2004]

Munar, C. J. 2001. Control de calidad en un programa de transferencias embrionarias a campo en Argentina: Método, Factores y Resultados. Argentina. [Conferencia] <http://www.munar.com.ar/recursos/controlTE.pdf> [Consulta: 13 Noviembre, 2004].

Munar, C. J.; Valdez A. M.; Ben G.; Mujica I. F. 1994. Selección de Receptoras y Sincronización de Celos en Bovinos [en línea]. Centro Biotecnológico Santa Teresita de Munar y Asociados S.A. Argentina. <http://www.muncar.com.ar./recursos/receptoras.htm> [Consulta: 01 Julio, 2004]

OIE Organización Mundial de Sanidad Animal. 2003. Artículo 3.3.1.1. Embriones recolectados in vivo; Artículo 3.2.1. Semen de bovino; Artículo 3.3.2 Embriones de bovinos de fecundados *in vitro* / ovocitos maduros *in Vitro*. [en línea] http://www.oie/inte/esp/normes/mcode/E_00132.htm [Consulta: 25 de Junio, 2004]

Orozco, R. P. 2002. México. Revisión de literatura sobre procedimientos de recolección, congelación y transferencia de embriones bovinos. (Tesina) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán. México.

Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. (Vol. I) (1ª ed.) Ediciones INTA, Argentina. pp. 27 - 34.

PROYECTO VIGIA. Manual de desinfección y esterilización hospitalaria. [en línea] <http://www.minsa.gob.pe/pvigia/MarketingManagement/final.pdf> [Consulta: 14 Junio, 2004]

Robilotti, S. y Couso, A. "¿Cómo preparar materiales?". [en línea] Esterilizar.com. Buenos Aires, Argentina. 24 de Julio 2003. <http://www.esterilizar.com/redirecciona.php?r=http://www.codeinep.com.ar/esterilizacion/preparaciondematerialesenvoltoriosymetodos1.htm> [Consulta: 15 Octubre, 2004]

Romo, G. S. 1993. Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino. Departamento de Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 177- 183

Secretaria de Agricultura y Ganadería. Manual de la Transferencia de embriones en ganado bovino. Tuxtla, Gutierrez, Chiapas; Gobierno del Estado de Chiapas. Fideicomiso de mejoramiento genético para la ganadería del estado (29 de Noviembre al 10 de Diciembre). Diciembre de 1999. Pp. 15 - 22, 29

Thibier, M. 2002. Procesamientos sanitarios necesarios para asegurar que la transferencia de embriones es el medio mas seguro para el intercambio de genes. UNCEIA. Laboratorio de Control de Reproductores. Números 58/ 63-79.

ANEXOS

PROTOCOLO PARA DONANTES

Donante N°:
Raza:
Edad:
Peso actual:

Procedencia:

ANAMNESIS

Fecha última participación en Exposición Rural:

Comentarios:.....
.....
.....

Número de partos:

Fecha del último parto:

Para la última gestación cuántos servicios recibió?:

¿Ha sido repetidora?:

Fecha del último celo:

Fecha del último servicio:

Tipo de parto:

1. Normal
2. Distócico
3. Ternero muerto
4. Cesárea

REVISACIÓN CLINICA

Condición Corporal:

Estado de los órganos genitales en general:

Estado de los ovarios en particular:

	Ovario Derecho	Ovario Izquierdo
Tamaño		
Folículos		
Cuerpos lúteos		

Semen que se utilizará:

Prueba de enhebrado con pipeta de I.A.:

Fecha:

Resultado:

1. Se enhebra sin dificultad
2. Se enhebra con dificultad
3. No se enhebra

(Mucci, 2004)

ANTECEDENTES DE SUPEROVULACION

Primer Tratamiento

Fecha:

Hormona:

Dosis:

Total de ovocitos y embriones:

Embriones transferibles:

Preñeces:

Terneros nacidos vivos:

Semen utilizado:

Segundo Tratamiento

Fecha:

Hormona:

Dosis:

Total de ovocitos y embriones:

Embriones transferibles:

Preñeces:

Terneros nacidos vivos:

Semen utilizado:

Tercer Tratamiento

Fecha:

Hormona:

Dosis:

Total de ovocitos y embriones:

Embriones transferibles:

Preñeces:

Terneros nacidos vivos:

Semen utilizado:

Cuarto Tratamiento

Fecha:

Hormona:

Dosis:

Total de ovocitos y embriones:

Embriones transferibles:

Preñeces:

Terneros nacidos vivos:

Semen utilizado:

(Mucci, 2004)

PROTOCOLO DE SUPEROVULACION

Donante N°:..... Raza:.....
Procedencia:.....
Edad:.....

Fecha último celo:
Observaciones:.....

Superovulación:.....
Droga:.....
Dilución:.....

Esquema de tratamiento:.....
Fecha del celo:

Inseminación Artificial (IA):
1° IA:
2° IA:
Observaciones:.....

Tacto previo:

	Ovario Derecho	Ovario Izquierdo
Folículos		
Cuerpos lúteos		

Recolección de embriones:..... Día: Hora:
Observaciones:.....

Evaluación morfológica:
Embriones viables: Clasificación:
Embriones anormales:
Ovocitos sin fecundar:
Total recolectado:

Celo post-superovulación:

.....
Firma del Profesional

(Mucci, 2004)

Resumen del preenfriamiento, enfriamiento, siembra, inmersión, almacenamiento y descongelamiento de embriones.

Proceso	Técnicas empleadas
Colección de embriones	Selección y superovulación de la donadora, inseminación durante el estro. Colección de embriones del tracto reproductivo femenino o los ovarios (quirúrgica, no quirúrgica o post mortem). Evaluación microscópica y clasificación de los embriones.
Soluciones crioprotectoras	Concentración escalonada gradual del crioprotector (DMSO, glicerol o preparado comercial). Preparación de pequeños volúmenes frescos. Las soluciones a las que se agrega suero no deben almacenarse por más de tres a cinco días, porque ocurre desnaturalización de las proteínas incluso a temperaturas óptimas. Las soluciones se mantienen refrigeradas o congeladas hasta su uso.
Preparación para el preenfriamiento	Los embriones se transfieren a concentraciones seriadas de crioprotectores Las pajillas se insertan en la jeringa empleando un adaptador de caucho para aspirar medio / burbujas de aire y embrión. Pajillas y cañas se etiquetan para su identificación futura. Las pajillas se calientan o llenan con solución salina fisiológica amortiguada con fosfato. Las pajillas se sumergen por ambos extremos en PVS azul o rojo.
Procedimientos de enfriamiento	El enfriamiento lento va de 0.5 a 1.6°C/min. El enfriamiento rápido va de 17 a 30°C/min. Rapidez de enfriamiento de 1°C/min desde la temperatura ambiente hasta -7°C. Rapidez de enfriamiento de 0.3°C/min hasta -35°C. Rapidez de enfriamiento de 0.1°C/min hasta -38°C.
Congelamiento, siembra e inmersión	Las pajillas se colocan en el congelador a -6°C y se mantiene ahí por 10 min Se enfrían unas pinzas en nitrógeno líquido. Las pajillas se sostienen cercas con pinzas frías hasta que se forman cristales de hielo. La pajilla sembrada se coloca en el congelador programable y se aplica el programa de enfriamiento. Se llena el frasco termo con nitrógeno líquido. El recipiente que contiene embriones congelados se retira del congelador y se sumerge en nitrógeno líquido. Las pajillas se cargan en cañas de aluminio y se almacenan en el recipiente con nitrógeno líquido a -196°C.
Descongelamiento	La rapidez de descongelamiento va de 20°C/min en calentamiento lento a 360-500°C/min para el rápido; la temperatura óptima para el descongelamiento del crioprotector varía entre 20 y 37°C. La temperatura del baño de agua se ajusta a 37°C. Las cañas se identifican por las marcas de color, y se extraen de ellas las pajillas para transferirlas en un pequeño recipiente que contiene nitrógeno líquido; se verifican las etiquetas antes de extraerlas del nitrógeno líquido. Las pajillas se sostienen por el cuello, se colocan en un baño de agua a 37°C y se retiran cuando el hielo se derrite. Los embriones permanecen en el fondo de las ampollas y pueden observarse al microscopio, contarse y extraerse con micropipeta para vaciar la pajilla. Las pajillas se descongelan durante 4 s en un baño de agua a 37°C y se extraen cuando el hielo se ha fundido. Se seca el agua de las pajillas.
Eliminación del crioprotector	El sello por calor o el tapón de PVC se cortan de la punta de las pajillas. Los embriones se lavan con gotas con gotas de diluciones seriadas de la mezcla crioprotectora en una caja de Petri estéril (diámetro de 35 mm). Se examinan los embriones en un microscopio estereoscópico para evaluar su calidad.

Fuente: Hafez, 2002.