

Series:
Comunicaciones Técnicas
ISSN 1667-4006

COMUNICACION TECNICA Nº 771
ÁREA PRODUCCIÓN ANIMAL

Manual de transferencia de embriones en ovinos y
caprinos

2da edición

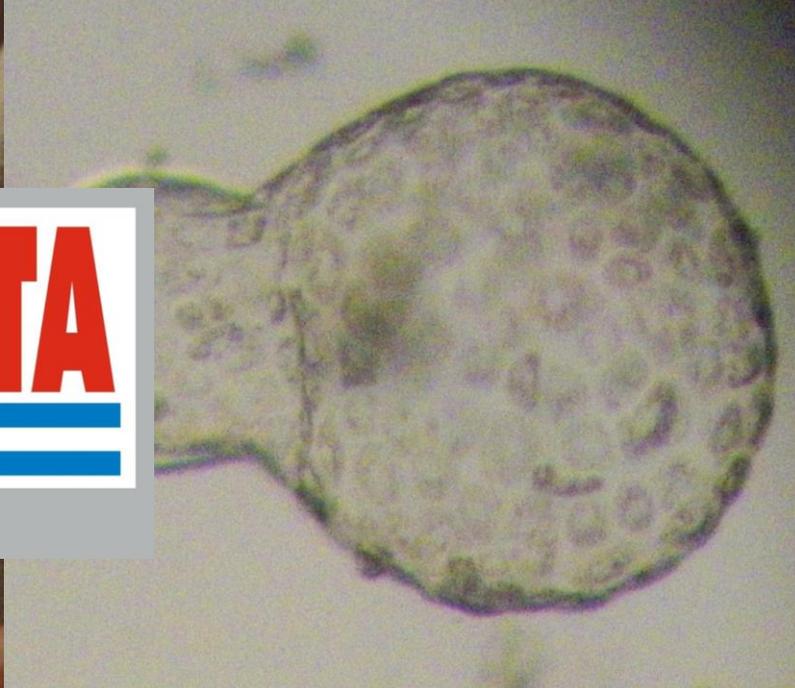
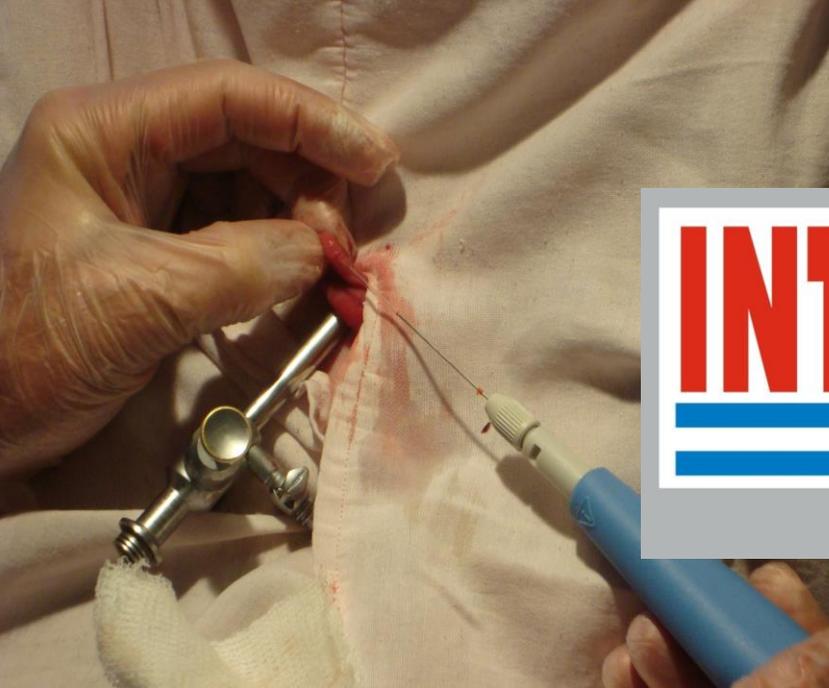
Gibbons, A.E.; Cueto, M.I.

2013

■ **Ediciones**

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Centro Regional Patagonia Norte
Estación Experimental Agropecuaria Bariloche. "Dr. Grenville Morris"
eeabariloche.cd@inta.gov.ar





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



Segunda Edición
2013

INTA EEA Bariloche
Centro Regional Patagonia Norte



Dr. A. Gibbons
Dra. M. Cueto

AREA DE INVESTIGACION EN PRODUCCION ANIMAL
GRUPO DE REPRODUCCION



INDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
Principios y consideraciones generales sobre la transferencia de embriones	4
1.- Fisiología hormonal de la reproducción	6
2- Estimulación ovárica para la ovulación múltiple	7
3- Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple	10
4- Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donante y receptora.....	13
5- Fecundación de la hembra donante	14
6- Colecta de embriones.....	16
7- Búsqueda de embriones	20
8- Clasificación de embriones	20
9- Siembra de embriones.....	23
10- Conservación de embriones	24
Técnica de congelamiento	26
Técnica de descongelamiento	27
Técnica de vitrificación	28
Eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones	29
Partición de embriones	30
Garantía sanitaria de la transferencia de embriones	30
Conclusiones Generales.....	31
Bibliografía	32
ANEXOS	39
Anexo 1. Grados de clasificación de embriones	39
Anexo 2. Medios de congelamiento	39
Anexo 3. Técnica de vitrificación.....	40

INTRODUCCIÓN

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

Los tratamientos hormonales para lograr una ovulación múltiple (OM) y la TE permiten utilizar intensivamente a las hembras genéticamente superiores. En conjunto ambas tecnologías son denominadas internacionalmente con las siglas en inglés “MOET” (“multiple ovulation and embryo transfer”). En los últimos 25 años se han logrado considerables avances en la MOET, como herramienta del mejoramiento genético en ovinos y caprinos, siendo aún necesario maximizar la producción y sobrevivencia de embriones para obtener varias crías de valor genético. Cabe consignar que una hembra podrá formar parte de un programa de transferencia en más de una oportunidad, de manera que es posible multiplicar su potencial reproductivo, al utilizarse ovejas de escaso valor genético como receptoras de embriones genéticamente superiores (Mueller 1993).

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

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

Estas biotecnologías posibilitan acortar el intervalo generacional y en consecuencia incrementar el avance genético. A su vez, conjuntamente con la inseminación artificial, son excelentes herramientas para el mejoramiento genético de majadas y hatos que se encuentren aislados de los proveedores de reproductores.

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

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

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

Principios y consideraciones generales sobre la transferencia de embriones

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

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

Es recomendable que las donantes y receptoras hayan tenido al menos una cría, y se debe considerar un mínimo de 2 meses post parto antes de comenzar los tratamientos hormonales.

Acortar estos tiempos puede significar una baja en la eficiencia productiva de embriones y en su posterior viabilidad.

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

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

Los programas de TE requieren un manejo intensivo de las donantes y receptoras. En el caso de recurrir a instalaciones extrañas, es preferible que los animales tengan un período de adaptación previo, de uno a dos meses, antes de comenzar los tratamientos hormonales. La identificación con caravanas con números visibles a la distancia, permite realizar los manejos necesarios sin cometer equivocaciones y sin provocar stress, que puede perjudicar los resultados.

A su vez, se deben considerar los aspectos sanitarios, nutricionales y reproductivos de los machos, así como su calidad seminal, ya sea que se utilicen en servicio natural o mediante la inseminación artificial con semen fresco, refrigerado o congelado.

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

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

1.- Fisiología hormonal de la reproducción

A continuación se presenta un breve recordatorio sobre las iteraciones hormonales en la reproducción.

La hormona liberadora de gonadotrofinas, *GnRH*, es una hormona secretada por el hipotálamo, cuyo centro de acción es la hipófisis. Es un decapeptido que estimula la liberación de gonadotrofinas (hormona luteinizante, LH, y folículoestimulante, FSH) por parte de la adenohipófisis. Por su parte, las gonadotrofinas poseen su centro de acción en las gónadas masculina y femenina. La secreción de estas hormonas está influenciada por condiciones externas (fotoperíodo, stress, nutrición) e internas (estrógenos, progesterona, feromonas).

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

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

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

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

Al final del ciclo estral y de no presentarse la preñez, el cuerpo lúteo secreta oxitocina e induce la liberación de prostaglandina uterina, responsable de la luteólisis (eliminación del cuerpo lúteo). Por ende, la concentración de progesterona desciende y se incrementan los pulsos de LH. En ese momento, la concentración creciente de estrógenos se presenta con valores muy reducidos de progesterona y por lo tanto, no es suficiente para inhibir la descarga de *GnRH*. Consecuentemente se presenta un nuevo ciclo estral con manifestación de estro y ovulación.

2- Estimulación ovárica para la ovulación múltiple

La OM ha sido inducida en la especie ovina y caprina mediante la administración de 1000 a 1200 UI de *PMSG* (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) o *eCG* (equine Chorionic Gonadotrophin), 48 horas antes de finalizar el tratamiento progestacional. Los tratamientos con *eCG* han dado resultados inferiores a los obtenidos mediante FSH, debido a que por su elevado peso molecular, tiene una vida media larga (21 horas) y provoca un crecimiento folicular disperso, induce la formación de folículos anaovulatorios, luteinización folicular prematura y reduce la fertilidad, recuperación y calidad embrionaria (Armstrong y Evans 1983, Armstrong y col. 1983, Moore y col. 1985, Tsunoda y Sugie 1989, Walker y col. 1989).

El tratamiento más aceptado para provocar la OM en ovinos y caprinos es mediante la aplicación de dosis decrecientes de *FSH* hacia el final del tratamiento progestacional. A diferencia de la *eCG*, la *FSH* presenta una vida biológica corta (3 a 4 horas), por lo que es necesaria su administración repartida en 6-8 aplicaciones cada 12 horas. La OM se presenta alrededor de las 60 horas post retiro de la esponjas con progestágenos (PREP) (Foto 1) (Walker y col. 1986).

La dosis de *FSH* se puede expresar en miligramos Armour, que es una unidad de actividad de un test biológico equivalente a 10 a 14 μg de hormona *FSH* pura. Las dosis recomendables para las cabras y las ovejas varían entre los 16 a 20 mg Armour (Tervit y col. 1984, González y col. 1991, Brebion y col. 1992); la respuesta ovulatoria a estas dosis está sujeta a los diferentes genotipos. El aumento de la dosis de *FSH* (mayor a 16-20 mg Armour) no produce un incremento de la respuesta ovulatoria. Asimismo la *FSH* puede expresarse en mg de NIH-*FSH*-P1, recomendándose dosis totales de hasta 200 mg por hembra donante. Para obtener una mejor respuesta ovulatoria se aconseja administrar *LH* en forma creciente hacia el final del tratamiento progestacional (Cognie y col. 1986, Baril y col. 1989). Se recomienda una relación *FSH/LH* de 3:1 (1er a 3er aplicación), 1:1 (4ta aplicación) y 1:2 (5ta aplicación).

El “tratamiento tradicional” que más hemos utilizado en ovinos de la raza Merino, durante la época otoñal, combina dosis decrecientes de *FSH* con una aplicación única de *eCG* hacia el final del tratamiento progestacional. Consiste en la colocación de esponjas intravaginales con progestágenos (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon®, Syntex, Argentina) durante 14 días y la administración de 200 mg de NIH-*FSH*-P1 (Folltropin-V®, Bioniche, Canadá) por oveja tratada, suministrados en 6 aplicaciones en forma decreciente de la siguiente manera: 50, 50, 30, 30, 20 y 20 mg de *pFSH* a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja intravaginal y administración de 200 UI de *eCG* (Novormon 5000®, Syntex, Argentina).

En la raza Merino y durante la estación reproductiva, hemos comprobado que es posible reducir la dosis total de *FSH* por oveja donante a 80 mg totales de NIH-*FSH*-P1, distribuidos en 6 aplicaciones de 18, 18, 14, 14, 8 y 8 mg, a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja

intravaginal y administración de 200 UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex, Argentina) (Figura 1, ver Punto 4). De esta manera, si bien mediante el tratamiento de baja dosis se observó una menor tasa de ovulación ($P < 0.05$), el número de embriones y la calidad embrionaria fue semejante, debido probablemente a la obtención de una mayor tasa de recuperación embrionaria y una mayor tasa de fertilización ($P > 0.05$) (Gibbons y col. 2010) (Tabla 1).

La presentación del celo post tratamiento con FSH (80 mg) es variable; sin embargo es habitual observar celo en las donantes entre las 24 a 48 horas PREP. También es posible obtener mediante este tratamiento más del 80% de las ovejas donantes en celo a las 36 horas PREP. La reducción del alto costo de la FSH a casi un tercio, brinda una ventaja económica para su utilización en los programas comerciales de TE.

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

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

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

* Embriones + ovocitos + zonas pelúcidas

** Ver Anexo 1. Grados de Clasificación de embriones

En otra experiencia hemos evaluado la eficiencia de dos tratamiento de OM (múltiples dosis de FSH vs una dosis de FSH) sobre los rendimientos de embriones en ovejas Merino, en estación reproductiva (otoño) y no reproductiva (primavera). Ambos tratamientos se realizaron al final de un tratamiento progestacional mediante la utilización de esponjas con 60 mg de MAP (Progespon®, Syntex, Argentina). El tratamiento en múltiples dosis de FSH consistió en 200 mg de FSH (Folltropin®), administrada en siete dosis decrecientes cada 12 horas y 300 UI de eCG al final del tratamiento progestacional. El tratamiento de una sola dosis de FSH se realizó mediante la aplicación conjunta de 70 mg de FSH (Folltropin®) + 300 UI de eCG al retiro de la esponja intravaginal. En la época reproductiva la proporción de hembras que respondieron con OM (98.1 vs 57.1%), la tasa de ovulación (13.9±0.8 vs 3.2±1.2), las estructuras recuperadas (7.9±0.6 vs 1.7±0.7), el total de embriones recuperados (6.0±0.5 vs 1.2±0.6) y embriones de buena calidad (5.1±0.5 vs 0.9±0.6) fueron más altos para las múltiples dosis de FSH respecto al protocolo de dosis única. De manera similar, en la época no reproductiva, la tasa de OM (11.3±1.8 vs 6.0±1.1), las estructuras recuperadas (6.6±1.2 vs 2.7±0.6) y la calidad embrionaria (3.2±0.9 vs 1.4±0.5)

fueron mayores para el protocolo de múltiples inyecciones de FSH respecto a la dosis única. En resumen, se evidenció que el tratamiento multidosis produjo una mayor respuesta multiovulatoria y un número mayor de embriones viables en ambas épocas del año (Cueto y col. 2011).

En la actualidad se han evaluado tratamientos multiovulatorios tendientes a no utilizar progestágenos en ovinos. Mayorga y col. (2011) y Quan y col. (2011) consideran que es posible obtener un buen número de embriones transferibles realizando los tratamientos de OM con FSH, y con la utilización de prostaglandinas.

Recientemente Gharbi y col. (2012) determinaron el efecto de un tratamiento previo con agonista de GnRH (buserelina) sobre el estado ovárico folicular, la respuesta a la inducción de la OM y la producción de embriones. La respuesta ovulatoria y el número de embriones transferibles en las ovejas tratadas fue significativamente mayor con respecto a las ovejas control (respuesta ovulatoria: 17.8 ± 1.56 vs 9.1 ± 1.11 , $P < 0.001$) (embriones transferibles: 10.2 ± 1.87 vs 4.1 ± 0.40 , $P < 0.01$). A su vez, en el grupo tratado con GnRH, se obtuvo un menor porcentaje de embriones degenerados (Tratadas: 7.27 vs Control: 20.40%, $P < 0.05$).

Una mayor eficiencia en la OM se logra cuando se utiliza *FSH* de origen porcino u ovino (Alberio y col. 1993). En contraste con la eCG, el empleo de la FSH determina una mejor migración espermática (Evans y Armstrong 1984), mayor tasa de fertilización cuando se emplea la inseminación artificial (Evans y col. 1984) y una mayor producción de embriones (Armstrong y col. 1983, Torres y col. 1987). Simoneti y col. (2008) evalúan la viabilidad de emplear FSH ovina en los tratamientos superovulatorios en ovejas Corriedale. Por su parte Agaoglu y col. (2012) investigaron el efecto de la estimulación con FSH ovina (Ovagen®) respecto a la FSH porcina (Folltropin®) sobre la respuesta superovulatoria y la calidad embrionaria en ovinos, concluyendo que la oFSH fue más eficaz que la pFSH únicamente en calidad de los embriones.

Otros tratamientos de OM están disponibles en la literatura, Menchaca y col. (2009) evalúan la información de los diversos tratamientos farmacológicos y obtienen una mejora significativa en el número de embriones transferibles por donante tratada. A su vez, Menchaca y col. (2010) revisan los conocimientos en la OM y la transferencia de embriones para los pequeños rumiantes, centrándose en la información reciente. También examinan la situación de las técnicas de reproducción asistida en el ganado ovino, analizando las perspectivas que ofrecen los últimos avances en la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.

El tratamiento en la especie caprina es similar al presentado para el ovino. El “tratamiento largo” consiste en la aplicación de las esponjas intravaginales con MAP durante 17 días, comenzándose a partir del día 15 post colocación de esponja intravaginal, con las dosis decrecientes de FSH al igual que en el ovino (Total: 200 mg de NIH-FSH-P1) (Folltropin-V®, Bioniche, Canadá). Al retiro de la esponja y conjuntamente con la 5ta dosis de FSH, se administra 200 UI de eCG. Otro tratamiento largo de alta eficiencia ha sido reportado por Lehloeny y Greyling (2010), y mediante la utilización de implantes de norgestomet por Medican y Gavin (2008). Para obtener una mejor tasa de fertilización, algunos autores recomiendan un “tratamiento corto” con progestágeno en esponja intravaginal de 11 días y una dosis de PF2 alfa, 48 horas antes de retirar las esponjas (día 9) (Corteel y col. 1988). La FSH se administra a partir del día 9 post colocación de las esponjas, en dosis decrecientes cada 12 horas. Este tratamiento debe ser realizado considerando que las cabras están con actividad cíclica estral. Un reciente

trabajo de Fonseca y col. (2013) describe dos tratamientos cortos de progesterona-Cloprostenol-FSH con y sin administración de rbST para la OM, siendo ambos igualmente efectivos para ser utilizados en las cabras Saanen en lactación.

En las cabras de raza Angora recomendamos, previo a la colocación de las esponjas con progestágenos, realizar un “efecto macho” para inducir la ovulación, realizando una detección de celo a corral durante dos días sucesivos (mañana y tarde) o introduciendo machos vasectomizados adultos durante 48 horas al 4% en el hato de hembras donantes.

La respuesta ovulatoria a los *tratamientos reiterados* de OM, está supeditada al origen de la FSH. Baril y col. (1992) demostraron una menor respuesta al utilizar FSH porcina respecto a la FSH caprina u ovina. Se sostiene que se presentan anticuerpos anti gonadotrofina heteroespecífica. Si bien se podría administrar antisuero, su costo es elevado. En la cabra, tratamientos repetidos de FSH porcina produjeron la formación de anticuerpos anti-FSH (Remy y col. 1991), observándose un descenso de la respuesta ovulatoria (40 a 50% en el 3er tratamiento, hasta un 70 al 80% en el 4to o 5to tratamiento). Sin embargo, este problema puede ser minimizado mediante el uso de FSH caprina (Carneiro 2007).

En algunas donantes se puede presentar una *regresión temprana del cuerpo lúteo* en los primeros 6 días post ovulación, afectando la recuperación y la calidad embrionaria, siendo posible prevenirla mediante el uso de inhibidores de la prostaglandina (Traldi y col. 1995), aplicando Meglumina Flunixin. Un tratamiento clásico consiste en comenzar con una dosis de 1,1 mg/kg/día de Flunixin Meglumina (Banamine®, Schering Plough, Veterinaria), a las 72 horas de retirados los progestágenos, durante tres días consecutivos. También es posible aplicar un progestágeno intravaginal a las 24 horas post celo (Melican y Gavin 2008).

Nota: Consideramos que siempre será muy importante determinar y ajustar las dosis de los tratamientos hormonales en base al número de embriones transferibles por donante, considerando varios factores que se detallan a continuación.

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

La respuesta hormonal de OM está condicionada por factores intrínsecos (variabilidad individual, dinámica folicular) y extrínsecos (raza, estación sexual, alimentación, edad).

La *variabilidad individual* de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de OM. Estudios realizados en vacunos demostraron que solamente el 68% de las hembras respondió con embriones transferibles. El 32% restante incluía a las hembras sin respuesta a la estimulación ovárica, sin recuperación de embriones u ovocitos, o con recuperación de embriones no transferibles (Donaldson 1984). Cordeiro y col. (2003) observaron que las mismas ovejas que no superovularon en respuesta al primer tratamiento hormonal con FSH, tampoco respondieron al segundo tratamiento multiovulatorio. Por consiguiente siempre se debe

tener presente que un porcentaje de hembras puede no responder al tratamiento hormonal de OM, debiéndose considerar la posibilidad de incrementar el número de donantes.

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

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

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

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

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

En base a un reciente ensayo (Bruno Galarraga y col. 2011a), en el cual se evaluó la respuesta multiovulatoria de ovejas ($n = 31$) tratadas con 800 UI de eCG, y posteriormente, con 80 mg de FSH, hemos determinado por observación laparoscópica que el 84% de las ovejas que respondió con una alta o baja tasa ovulatoria al primer tratamiento con eCG, conservó su clasificación como donante de alta o baja en respuesta al tratamiento con FSH (tasa de recurrencia). La elevada tasa de recurrencia de la respuesta ovulatoria permite concluir que la selección de las ovejas donantes por su primer respuesta a un tratamiento de OM, brinda la posibilidad de obtener un mayor número de embriones por donante y reduce los costos operativos en la implementación de un programa de OM con TE.

Como alternativa a la evaluación laparoscópica de la respuesta ovárica, se presenta la posibilidad de determinar la concentración sanguínea de progesterona 1 día antes de la recolección de embriones, lo que permite la identificación de las ovejas donantes que no responden o responden con una baja tasa de ovulación, así como la identificación de animales con una buena respuesta ovulatoria (>9 CL) (Amiridis y col. 2002).

La respuesta ovulatoria a los tratamientos hormonales ha sido estudiada en base a la *dinámica folicular* en los ovarios y está positivamente correlacionada con el número de folículos chicos (2 a 3 mm de diámetro) al momento de la primera aplicación de FSH, la cantidad de folículos medianos (4-5 mm) al momento de finalizado el tratamiento progestacional y el número de folículos grandes (>6 mm) al momento del estro (González-Bulnes y col. 2000). Sin embargo, en la raza Merino, nosotros no encontramos una relación significativa entre el número de cuerpos lúteos y el número de folículos chicos o totales al inicio del tratamiento de OM. Si bien se evidenció una relación significativa entre el número de folículos grandes y la respuesta multiovulatoria al tratamiento con FSH ($P < 0.05$), su coeficiente de determinación ($R^2 = 0.13$) indicaría que la relación existente entre estas variables es baja (Bruno Galarraga y col. 2011a).

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

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

La *estación sexual* también influye sobre el número medio de ovulaciones por hembra ovina, siendo superior en la estación reproductiva respecto al período de anestro (Torres y col. 1984, Cueto y col. 2011). Esta diferencia no se observó en las cabras lecheras (Baril y Vallet 1990b), aunque la calidad de los embriones fue superior en la época reproductiva (Baril y Vallet 1990a). Nuestros resultados indican que durante el anestro estacional, cuando se aplican tratamientos múltiples con FSH en ovejas Merino, disminuye el número promedio de embriones recuperados y se presenta una menor tasa de fertilización, si bien no se afecta el número medio de embriones de buena calidad (Cueto y col. 2011).

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

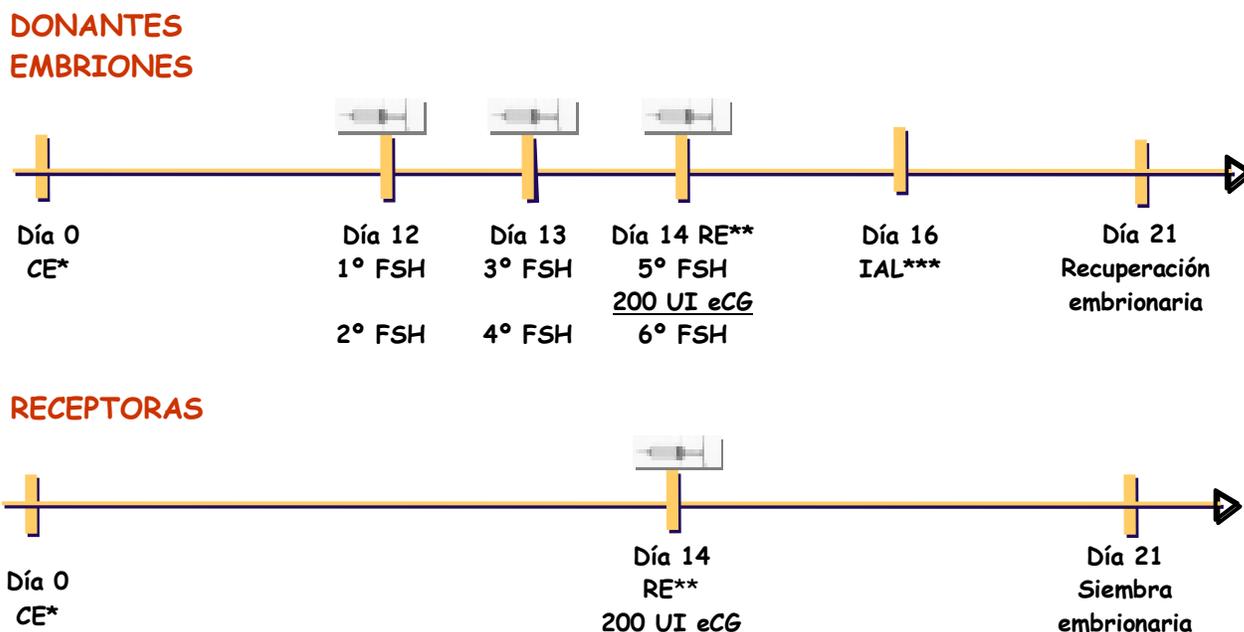
Respecto a la *edad* de las donantes, Bari y col. (2000) concluyen que mientras las ovejas adultas tienen una mayor tasa de ovulación y producción de embriones, en las borregas se presenta una mayor proporción de embriones de alta calidad. A su vez, el número de partos y la edad de las donantes son determinantes en la eficiencia de la OM (Lehloenya y Greyling 2010).

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

La sincronización de los estros de las receptoras mediante tratamiento progestacional se realiza en forma conjunta con las hembras donantes. En general se debe disponer de 5 a 6 receptoras por cada oveja donante. El objetivo es lograr que donantes y receptoras presenten sus estros el mismo día o con un desfase de 12 horas (Shelton y Moore 1966).

Los análogos sintéticos de la progesterona, el FGA (acetato de fluorogestona) y el MAP (acetato de medroxiprogesterona), son comúnmente empleados en pesarios (esponjas intravaginales) para los tratamientos de sincronización de celos. Se pueden aplicar durante 14 días en el ovino y 17 días (tratamiento largo) o 11 días (tratamiento corto + prostaglandina) en el caprino. En Australia y Nueva Zelanda es muy frecuente la utilización de progesterona vía vaginal, empleando el CIDR (Control Interno de Liberación de Droga).

La eCG se utiliza al final de los tratamientos con esponjas intravaginales con progestágenos para la sincronización de celos. En los ovinos y caprinos, se recomienda la colocación de una esponja intravaginal y la administración de eCG al momento de su retiro (Figura 1). La dosis de eCG varía según especie, raza y estado fisiológico reproductivo (valores indicativos por hembra: 200 a 400 UI).



* Colocación de esponjas intravaginales.

** Retiro de esponjas intravaginales.

*** Inseminación artificial laparoscópica.

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

5- Fecundación de la hembra donante

La fecundación en las hembras donantes puede realizarse mediante servicio natural a corral o mediante inseminación artificial (IA), con semen fresco o congelado. El servicio a corral se realiza cada 12 horas, desde el comienzo del celo y hasta su finalización. Otros autores recomiendan realizar el servicio cada 6 horas (Ishwar y Memon 1996).

La inseminación cervical en ovejas se considera poco eficiente para los programas de OM. La utilización de la laparoscopia para la deposición de semen intrauterino es una técnica que brinda aceptables tasas de fertilización en las donantes superovuladas cuando se utiliza semen fresco o congelado-descongelado y a su vez, permite aumentar las tasas de fertilización, así como reducir las dosis de inseminación. Bari y col. (2000) compararon dos sistemas de fertilización (servicio natural más IA intrauterina por laparoscopia con semen fresco vs monta natural), determinando que la IA no afecta la tasa de recuperación embrionaria y se mejora la tasa de fertilización y la calidad y sobrevivencia embrionaria.

- Dosis de inseminación

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

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

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

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

- Momento óptimo de realización de la IA y tasa de fertilización

La eficiencia de la fertilización en las hembras multiovoladas ha presentado resultados muy variables en función de la técnica de fertilización empleada, el momento de inseminación (con detección de celos o a tiempo fijo, IATF) y la respuesta multiovulatoria al tratamiento hormonal.

Se debe tener en cuenta que mediante el servicio natural o IA por vía vaginal en las ovejas donantes de alta respuesta ovulatoria (más de 10 a 12 ovulaciones) se puede obtener una baja tasa

de fertilidad, debido a la reducción del transporte espermático en el tracto reproductivo (Cognie 2003).

En ovejas de raza Lacaune, mediante IA vía vaginal con *semen fresco* a las 48 y 60 horas PREP, se han obtenidos tasas de fecundación entre el 61 al 78% (Brebion P. sin publicar citado por Baril y col. 1993), en tanto que en la misma especie, Armstrong y Evans (1984) obtuvieron una fertilidad del 82%. En caprinos, Baril y col. (1989) reportaron una fertilidad del 60% al realizar la IA intracervical con semen fresco.

En el caso de utilizar el semen fresco por IA laparoscópica (IAL), en ovinos se recomienda realizar la IA entre las 24 a 28 horas post celo, lográndose porcentajes de fertilización entre el 81 y 82% (Lymberopoulos y col. 2001). Bari y col. (2001, 2003) recomiendan realizar la IAL entre las 44 a 46 horas PREP.

En el caprino, Greyling y col. (2002) recomiendan realizar la IAL con semen fresco a las 36 y 48 horas post retiro del CIDR. En tanto que Vallet y Baril (1990) recomiendan realizarla entre las 20 y 24 horas post inicio del celo, obteniendo una tasa de fertilización del 78.3%.

Si se utiliza *semen congelado* para la IATF por laparoscopia, es conveniente realizar la IA a las 44 (ovinos) y 46 horas (caprinos) PREP, siendo posible alcanzar valores medios de fertilidad del 70 al 75% en caprinos (Fieni y col. 1990).

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

Sin embargo, se recomienda inicialmente realizar la inseminación laparoscópica luego de detectado el celo. En nuestra experiencia, en la raza Merino, realizamos la IA con semen congelado sobre celo detectado y con una dosis de 100 millones de espermatozoides totales. Las ovejas detectadas en celo a las 24 horas PREP se inseminan 24 post celo y las que presentan celo a las 36 o 48 horas se inseminan a las 12 horas de detectadas en estro, obteniendo un porcentaje de fertilización de 78.6% (Foto 2).

La tasa de fecundación en los caprinos es muy dependiente del nivel de respuesta ovulatoria al tratamiento de estimulación. En las cabras Alpinas y Saanen, la fertilidad disminuye cuando la respuesta ovulatoria es elevada (>15 cuerpos lúteos, 49% vs <15 cuerpos lúteos, 66%) (Baril y col. 1989). Esta misma observación se evidenció en ovinos lecheros (Brebion P. sin publicar citado por Baril y col. 1993).

6- Colecta de embriones

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

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

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

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

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

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

Las técnicas para la colecta de embriones en los rumiantes menores se llevan a cabo bajo anestesia general. Es indispensable que los animales no reciban alimento ni agua en las 24 horas previas a la operación. En ovinos, se puede utilizar un tranquilizante intramuscular (2 mg/10 kg, Xilazina 2%) y un anestésico endovenoso (50 mg/10 kg, Thiopental sódico). También es posible realizar una combinación de Xilazina (2 mg/10 kg, Xilazina 2%) y Ketamina (1.1 mg/10 kg,

Clorhidrato de Ketamina), administrados ambos en forma intramuscular (Xilazina: 0.2 ml, Ketamina: 3 ml, respectivamente). Asimismo se puede aplicar un anestésico local en el área quirúrgica (1 ml, Lidocaína 2%). En el caprino, cuando se administra Ketamina, es recomendable ajustar la dosis según los signos de profundización de la anestesia.

A continuación se detallan las técnicas de recolección de embriones en ovinos y caprinos:

6a) Técnica quirúrgica

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

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

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

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

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

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

Mediante la recuperación quirúrgica de embriones se obtienen tasas medias de recolección superiores a las reportadas mediante los procedimientos no quirúrgicos (tasa media de recolección, 50-60%). Sin embargo, la tasa de recuperación embrionaria decrece significativamente con las sucesivas intervenciones quirúrgicas, como consecuencia de la formación de adherencias. Torres y Sevellec (1987) evaluaron la eficiencia de tres recuperaciones quirúrgicas embrionarias sucesivas en ovinos, obteniendo los siguientes valores: 88, 52 y 24% para la primera, segunda y tercer intervención, respectivamente. En nuestra experiencia y en coincidencia con estos resultados, la tasa de recuperación embrionaria disminuyó en la segunda y tercera intervención (41.4 y 34.5%, respectivamente) en comparación con la primera (66.1%) ($P < 0.05$) (Cueto y col. 2010). Aún así, la recuperación quirúrgica embrionaria mediante tres

tratamientos sucesivos de OM nos permitió obtener un valor medio de 18.5 embriones por oveja donante en un período de 2.5 meses. En la Tabla 4 se presentan las variables productivas registradas en las sucesivas recuperaciones embrionarias

Tabla 4. Eficiencia productiva de embriones en ovejas Merino tratadas con 80 mg de pFSH + 200 UI de eCG en tres recuperaciones quirúrgicas embrionarias sucesivas.

	Recuperaciones embrionarias		
	Primera	Segunda	Tercera
Cuerpos lúteos (\pm SEM)	13.8 \pm 2.2 a	12.1 \pm 2.2 a	12.0 \pm 2.2 a
Embriones totales (\pm SEM)	8.3 \pm 1.4 a	6.3 \pm 1.4 ab	3.9 \pm 1.4 b
Embriones Grados 1-2* (\pm SEM)	7.4 \pm 1.3 a	5.7 \pm 1.3 ab	3.2 \pm 1.3 b
Recuperación de embriones totales (%)	66.1 \pm 7.5 a	41.4 \pm 7.5 b	34.5 \pm 7.9 b
Recuperación de embriones Grados 1-2 (%)	84.8 \pm 8.4 a	89.5 \pm 9.4 a	67.4 \pm 8.9 a
Tasa de fertilización (%)	100 \pm 5.6 a	95.8 \pm 6.3 a	85.3 \pm 6.0 a

Valores con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

* Grados de calidad embrionaria 1-4, IETS 1998

En base a la información obtenida en la experiencia anterior, se compararon las ovejas que presentaron una baja respuesta al primer tratamiento multiovulatorio (Grupo BR, \leq 14 CL) respecto a las que tuvieron una alta respuesta ovulatoria (Grupo AR, $>$ 14 CL). Los resultados se presentan en la Tabla 5. Al considerarse la suma de los tres tratamientos sucesivos, el grupo AR duplicó el total de embriones recuperados y transferibles por oveja donante (24.0 y 21.6 respectivamente), en comparación con el grupo BR (13.0 y 11.0, respectivamente).

Tabla 5. Efecto de tres tratamientos hormonales sucesivos sobre la respuesta ovulatoria y la producción de embriones en ovejas de la raza Merino (recuperaciones quirúrgicas).

Respuesta ovulatoria	Tratamientos hormonales sucesivos								
	Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3		
	CL	E	ET	CL	E	ET	CL	E	ET
Baja ($\bar{x} \pm$ SEM)	8.4 \pm 1.8 ^{aA}	6.4 \pm 2.2 ^{aA}	5.6 \pm 2.1 ^{aA}	8.0 \pm 2.4 ^{aA}	4.2 \pm 2.1 ^{aAB}	3.6 \pm 1.8 ^{aAB}	7.8 \pm 3.0 ^{aA}	2.4 \pm 1.1 ^{aB}	1.8 \pm 1.2 ^{aB}
Alta ($\bar{x} \pm$ SEM)	19.2 \pm 1.8 ^{bA}	10.2 \pm 2.2 ^{bA}	9.2 \pm 2.1 ^{bA}	16.2 \pm 2.4 ^{bA}	8.4 \pm 2.1 ^{bAB}	7.8 \pm 1.8 ^{bAB}	16.2 \pm 3.0 ^{bA}	5.4 \pm 1.1 ^{bB}	4.6 \pm 1.2 ^{bB}

Letras diferentes dentro de una misma columna (a, b) o dentro de una misma fila (A, B) indican diferencias significativas (P<0.05) entre ovejas con alta y baja respuesta ovulatoria y entre tratamientos multiovulatorios en un mismo grupo de ovejas, respectivamente

CL: Cuerpo lúteo. E: Número de embriones recuperados por oveja donante. ET: Número de embriones transferibles por oveja donante (Grados 1 y 2; IETS 1998)

La repetibilidad de la respuesta ovulatoria al tratamiento de OM presentó un valor de 0.84 (P<0.05). Por consiguiente, la selección de las donantes según su respuesta ovárica al primer tratamiento multiovulatorio, sería un buen método para reiterar el tratamiento hormonal solamente en las hembras que dieron una mayor producción de embriones en su primera recuperación (Bruno Galarraga y col. 2011b).

6b- Técnicas no quirúrgicas

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

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

Recientemente, Gusmão y col. (2009) desarrollaron una novedosa técnica de *recuperación transcervical de embriones*, a partir de un estudio que permitió la expansión del cuello uterino en ovejas Dorper mediante la aplicación intravaginal de un análogo sintético de prostaglandina E1 (PGE1). Esta técnica permitió obtener una media de 6.0 (± 3.6) embriones por donante. Gusmão (2011) presenta una interesante revisión sobre esta novedosa tecnología de recuperación transcervical de embriones.

En caprinos, la recuperación transcervical de embriones puede ser considerada una alternativa viable para la TE (Goel y col. 1995, Pereira y col. 1998, Sohnrey y col. 2000, Lima-verde y col. 2003). Fonseca y col. (2013) realizaron la recuperación transcervical embrionaria obteniendo valores medios según el tratamiento de multiovulación y semejantes a los valores medios obtenidos en la recuperación quirúrgica (8.2 a 13.4 embriones viables). Sin embargo, se debería realizar un mayor número de ensayos a fin de mejorar tanto la penetrabilidad del cuello uterino como la tasa de recuperación de embriones.

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

Independientemente de la técnica de recuperación embrionaria utilizada, y si se desea contar con la seguridad de que las hembras donantes no queden preñadas por embriones no recuperados, se recomienda la administración de prostaglandinas PF2 alfa al final de las intervenciones (125 μ g de Cloprostenol/donante).

7- Búsqueda de embriones

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

8- Clasificación de embriones

La clasificación de los embriones se realiza en base a sus aspectos morfológicos y con 10 a 40 aumentos. Una micropipeta o una fina pipeta de vidrio permitirá mover los embriones, para poder observarlos desde distintos ángulos. Se debe observar la integridad de la membrana pelúcida y su esfericidad. El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera hasta un máximo de 24 horas de retraso (Figura 2). Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración. El grado de calidad es una estimación de la predicción de sobrevivencia embrionaria. Uno de los sistemas de clasificación consiste en cuatro categorías (grados 1, 2, 3 y degenerados). Grado 1: Indica que el embrión es casi perfecto con más de 98% de la masa celular activa y saludable. Grado 2: Indica que el 70 a 98% de la masa celular es activa y saludable; pueden presentarse algunas blastómeras extruidas. Grado 3: Indica que los embriones son de baja calidad, presentan menos del 70% de la masa celular activa y saludable; varias blastómeras se presentan extruidas. Los embriones degenerados no presentan signos de masa celular activa y la mayoría de las membranas presentan ruptura (Flores- Foxworth 2007). En el Anexo 1 se presenta la clasificación de calidad embrionaria convenida por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS).

En algunos embriones se puede observar desprendimiento parcial de células en el espacio perivitelino. Esta característica es tolerable si el resto conforma una masa celular uniforme y sin opacidad. Cuando los embriones son dudosos, se recomienda realizar una segunda observación a las dos horas. Este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presentan diferencias significativas en la sobrevivencia embrionaria cuando se transfieren embriones de calidad regular respecto a la calidad buena o excelente (Anexo 1) (Bari y col. 2003) (Tabla 6). Esta diferencia es mayor cuando se procede a la siembra de embriones que fueron congelados o vitrificados en nitrógeno líquido.

Tabla 6. Tasa de sobrevivencia de embriones de diferentes grados de calidad en ovinos Scottish Blackface (Bari y col. 2003).

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

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

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

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

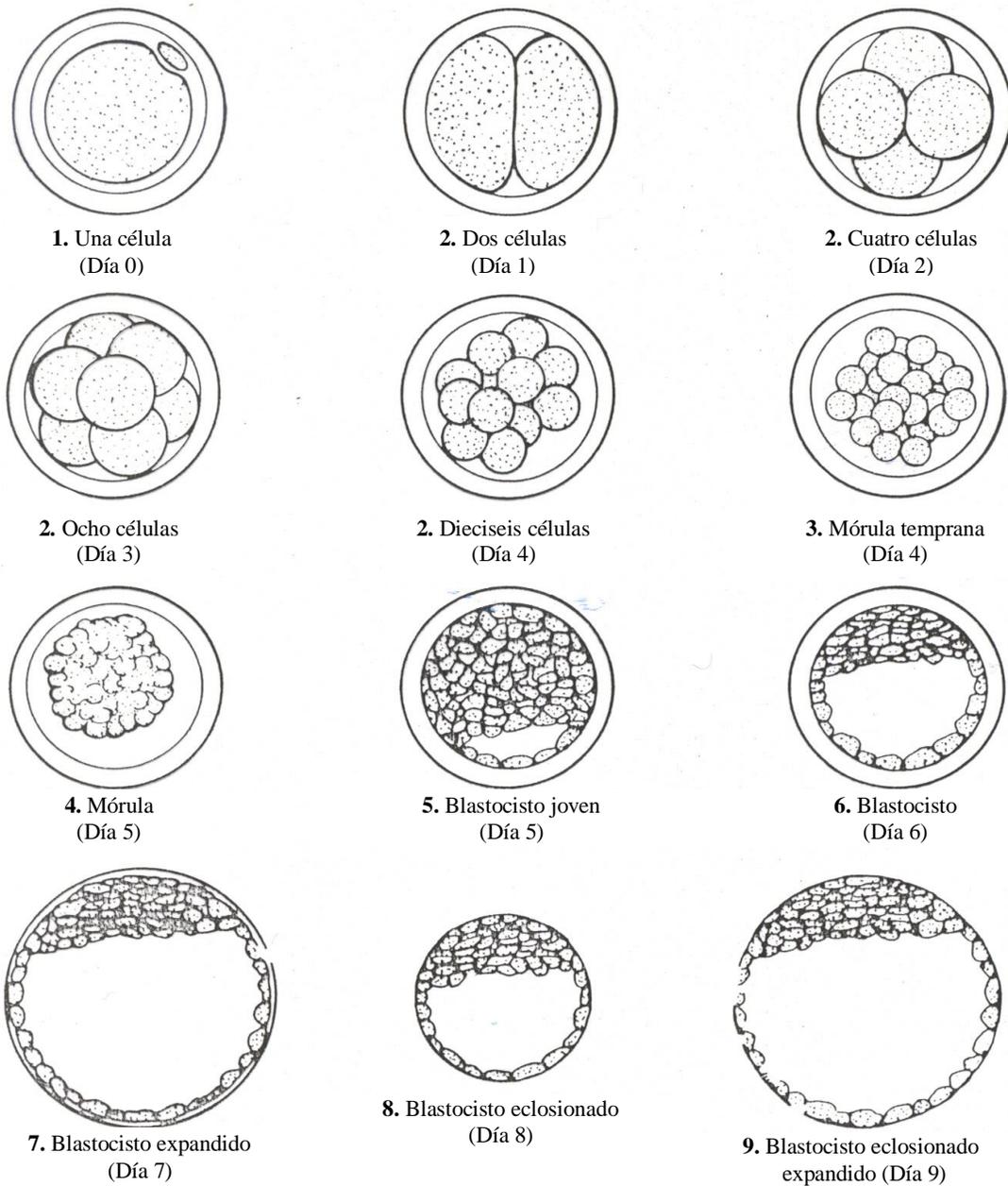


Figura 2. Esquema de la cronología del desarrollo embrionario en la oveja (**días post celo**). El código para el estadio de desarrollo es numérico. **1.** Identifica un ovocito no fertilizado o un embrión de una célula. **2.** Identifica embriones con 2 a 16 células. **3.** Identifica una mórula temprana.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

9- Siembra de embriones

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la recuperación de los embriones y su siembra no supere las 2 horas en el medio de conservación embrionario. Si se trata de embriones previamente congelados, el tiempo máximo entre descongelamiento y siembra se reduce a 20 o 30 minutos.

Los 2 métodos más utilizados en la siembra de embriones son el quirúrgico o no quirúrgico por laparoscopia (González y col. 1991). En ambos casos se procede a realizar una punción en la cara dorsal del cuerno uterino, a 1 cm de la unión utero tubárica. Mediante una micropipeta, se deposita el embrión en la luz uterina (acondicionado en 10 µl de PBS).

Existe una técnica combinada en la cual se visualiza el cuerno uterino por laparoscopia, se realiza una pequeña incisión de 1 cm en la línea media abdominal, y mediante una pinza no traumática, se exterioriza el cuerno uterino para realizar la siembra embrionaria (Siembra semi-quirúrgica de embriones) (Fotos 3 y 4).

El sitio habitual de siembra de los embriones es el cuerno ipsilateral del ovario con cuerpo lúteo. Se debe tener la precaución de evitar una lesión traumática del cuerpo lúteo durante la manipulación de la siembra embrionaria.

En referencia a la siembra embrionaria por vía cervical, es de muy baja utilización debido a la dificultad que presenta el paso del cérvix (Lewalski y col. 1991, Flores-Foxworth y col. 1992, Wulster-Radcliffe y col. 1999). Recientes trabajos de Masoudi y col. (2012) consideran la factibilidad de utilizar la siembra transcervical embrionaria mediante tratamientos combinados de estradiol y oxitocina. En Brasil, se ha comenzado con la transferencia transcervical de embriones en cabras. Si bien los primeros ensayos se han realizado con un número reducido de donantes, se ha logrado obtener un 50% de sobrevivencia embrionaria (Fonseca, comunicación personal).

En las cabras lecheras se ha determinado una tasa superior de sobrevivencia embrionaria (crías nacidas/embriones transferidos) cuando se realiza una siembra doble (Moore y Eppleston 1979, Armstrong y col. 1983, Tervit y col. 1983). En los ovinos, Baril y col. (2003) informaron que la tasa de supervivencia de embriones es superior cuando se transfieren por pares que cuando se transfiere sólo un embrión. Sin embargo y en oposición a estos resultados, Cseh y Seregi (1993) obtuvieron una mayor sobrevivencia embrionaria al sembrar un embrión por hembra receptora. Por consiguiente, se debe considerar la capacidad de cría de la hembra receptora para no afectar el crecimiento de las crías post parto.

La utilización del laparoscopio permite realizar una buena clasificación de las receptoras por su respuesta ovulatoria. En ciertas oportunidades y en especial cuando se trata de cabras, se presentan receptoras con folículos quísticos o cuerpos lúteos regresados. Estas hembras no deben ser utilizadas como receptoras. Se debe asegurar que se dispone de hembras con uno o dos cuerpos lúteos correspondientes al día 6 o 7 del ciclo estral. Asimismo se debe tener presente, al realizar la selección de las receptoras, que la sobrevivencia embrionaria estaría influenciada por

el número de cuerpos lúteos. Armstrong y col. (1983) obtuvieron valores del 52, 63 y 75% de sobrevivencia embrionaria con recipientes con 1, 2 y 3 cuerpos lúteos. Sin embargo Bari y col. (2001) no consideran que se presenten diferencias significativas. A su vez estos autores, mencionan que la edad y pariciones anteriores de las ovejas receptoras adultas no afectan la tasa de sobrevivencia embrionaria.

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

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

10- Conservación de embriones

10a- Conservación por enfriamiento a 5 °C

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

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

Recientemente hemos realizado un ensayo de refrigeración con blastocistos ovinos (n= 26), a los que se les realizó un descenso paulatino de la temperatura en medio de conservación, desde los 25 °C y a razón de 1 °C por minuto hasta 5 °C, permaneciendo en dicho medio durante 24 horas. Conjuntamente con otro lote de blastocistos recuperados 24 horas después (grupo testigo, n= 24), fueron colocados en TCM 199, se cubrieron con aceite mineral y se ubicaron en estufa a 39.5 °C con 5% CO₂ durante 36 horas. Posteriormente se determinó la tasa de eclosión en cada lote (refrigerado vs embriones frescos). El 61.5% de los embriones refrigerados y el 62.5% del grupo testigo presentaron eclosión embrionaria (información sin publicar). A futuro se deberá evaluar esta metodología de conservación, mediante la siembra de los embriones refrigerados, a fin de determinar su sobrevivencia embrionaria in vivo.

10b- Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido

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

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

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

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

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

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

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

Técnica de congelamiento

Una vez recuperados y seleccionados los embriones, se colocan sucesivamente en soluciones crecientes de etilenglicol 0.5, 1.0, 1.5 M durante 10 minutos/solución (Anexo 2) en PBS con 20% de suero fetal bovino a temperatura ambiente. Durante este período se produce encogimiento celular por pérdida de agua y lenta reexpansión por ingreso del crioprotector.

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

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

Una vez acondicionados los embriones, las pajuelas se disponen en el congelador programable o bien se puede utilizar un congelamiento manual. Para éste es necesario disponer de un cilindro de acero, donde se ubican las pajuelas y el sensor de un termómetro, unido a un vástago agujereado (con barra en T) que permita graduar el descenso del conjunto en la boca del termo de nitrógeno.

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

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

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

Técnica de descongelamiento

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

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

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

En la especie ovina los porcentajes de embriones viables post descongelamiento son superiores para los blastocistos respecto a las mórulas (67 vs 31%) (de Paz y col. 1994). En la especie caprina se ha observado una mayor sobrevivencia de los embriones en estado de blastocisto expandido o sin pelúcida (Chemineau y col. 1986, Li y col. 1990). El inconveniente de realizar el congelamiento de embriones sin pelúcida es la restricción sanitaria.

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

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

Técnica de vitrificación

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

El procedimiento para la vitrificación se realiza a temperatura de laboratorio (25 °C), en tres pasos sucesivos de inmersión de los embriones en soluciones crecientes de glicerol y etilenglicol, en PBS con 20% de suero fetal bovino. Brevemente: 1) Glicerol 10% durante 5 minutos, 2) Glicerol 10% + Etilenglicol 20% durante 5 minutos y 3) Glicerol 25% + Etilenglicol 25% durante 30 segundos (Anexo 3). A continuación los embriones son aspirados en tips con 1 µl de medio (2 embriones/tip) y sumergidos en criotubos con nitrógeno líquido (Gibbons y col. 2011).

La *desvitrificación* se realiza “al aire” a 37 °C durante 6 segundos. Inmediatamente los embriones son colocados en soluciones a 25 °C de: 1) Glicerol 12.5% + Etilenglicol 12.5% + Sucrosa 0.5 M en PBS con 20% de suero fetal bovino (PBS-SFB). 2) 0.5 M de Sucrosa en PBS-SFB y 3) 0.25 M de Sucrosa en PBS-SFB (5 minutos por solución). Por último, los embriones son lavados 2 veces en PBS-SFB (2.5 minutos por solución) (Gibbons y col. 2011) (Anexo 3).

Mediante esta metodología en ovinos *in vitro* hemos obtenidos una tasa de protusión embrionaria del 50% para las mórulas y 81.6% para los blastocistos (Gibbons y col. 2008); y en caprinos, del 61% para blastocistos (Gibbons y col. 2009). Al realizar la siembra de embriones vitrificados/desvitrificados, en la especie ovina hemos obtenido una tasa de sobrevivencia embrionaria del 41% (mórulas) y 50% (blastocistos) y una tasa de preñez del 47% (mórulas) y 50% (blastocistos) (Gibbons y col. 2011). En caprinos, mediante la vitrificación de blastocistos, hemos obtenido una tasa de sobrevivencia embrionaria entre el 64 al 70% y un porcentaje de preñez entre el 64 al 86% (Traldi y col. 2009, Gibbons y col. 2010, 2011). Esta técnica no es viable para la vitrificación de mórulas caprinas.

Mayor información bibliográfica sobre la eficiencia de la vitrificación de embriones ovinos y con diversos procedimientos ha sido presentada por Bettencourt y col. (2009) y Green y col. (2009).

Eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones

A continuación se presentan valores medios de referencia de la eficiencia de las diferentes etapas de la OM y TE:

- Número de cuerpos lúteos por hembra donante: ovino, 11; caprino, 14-15.
- Tasa de recuperación de embriones + ovocitos por vía quirúrgica: 60 a 70% en ambas especies.
- Tasa de fertilización por IA laparoscópica con semen fresco: 80% en ambas especies.
- Tasa de selección de embriones para congelamiento: 80 a 90% en ambas especies.
- Tasa de selección de embriones post descongelamiento: 70 a 90% en ambas especies.
- Tasa de sobrevivencia embrionaria por siembra directa: 60-70% en ambas especies.
- Tasa de preñez por siembra directa: 50-70 % en ambas especies.

- Número de crías nacidas por hembra donante:
 - TE inmediata: Ovinos: 4 corderos/oveja donante.
Caprinos: 5 cabritos/cabra donante.
 - TE congelados: Ovinos: 2 a 3.2 corderos/oveja donante.
Caprinos: 2 a 3.6 cabritos/cabra donante.

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

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

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

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

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

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

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

Partición de embriones

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

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

Garantía sanitaria de la transferencia de embriones

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

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

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

Conclusiones Generales

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

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

Bibliografía

- Alberio R, Iovanitti B, Vívoli C. 1993. Superovulación de ovejas Merino Australiano por medio de FSH ovina o porcina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 13 supl. 1: 59 (abstr.).
- Amiridis GS, Rekkas CA, Fthenakis GC, Vainas E, Lymberopoulos A, Christodoulou V, Belibasaki SB. 2002. Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. *Theriogenology* 57: 1143-1150.
- Armstrong DT, Evans G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31-42.
- Armstrong DT, Evans G. 1984. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *J. Reprod. Fert.* 71: 89-94.
- Armstrong DT, Miller BG, Walton EA, Pfitzner AP, Warnes GM. 1982. Endocrine response and factors which limit the response of follicles to PMSG and FSH. Embryo transfer in cattle, sheep and goats. pp. 8-15, Eds.: Shelton J, Trounson AO, Moore NW. *Aust. Soc. Reprod. Biol.* Sydney.
- Armstrong DT, Pfitzner AP, Warnes GM, Seamark RF. 1983. Superovulation treatment and embryo transfer in Angora goats. *J. Reprod. Fert.* 67: 403-410.
- Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresign W, Murray TMA, Merrell B. 2001. The repeatability of superovulation response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology* 56:147-155.
- Bari F, Khalid M, Haresign W. 2003. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology* 59: 1265-1275.
- Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet JC. 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthyg* 24: 101-115.
- Baril G, Remmy B, Lebouef B, Vallet JC, Beckers JF, Saumande J. 1992. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. 8th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 126 (abstr.).
- Baril G, Vallet JC. 1990a. Effect of seasons on embryo production in dairy goat hand mated or cervically inseminated after superovulated treatment. 6th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 1: 118 (abstr.).
- Baril G, Vallet JC. 1990b. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. *Theriogenology* 34: 303-311.
- Baril G, Brebion P, Chesné P. 1993. Manuel de formation pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. *FAO 115*, ISSN, 1014-1099.
- Bettencourt EM, Bettencourt CM, Silva JC, Ferreira P, Matos CP, Romão RJ, Rocha A. 2009. Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. *Small Rum. Res.* 82: 112-116.
- Bilton RJ, Moore NW. 1976. In Vitro culture, storage and transfer of goats embryos. *Aust. J. Biol. Sci.* 29: 125-129.
- Brebion P, Baril G, Cognie Y, Vallet JM. 1992. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann. Zootech.* 41: 331-339.

- Bruno Galarraga M, Cueto M, Subiabre M, Pereyra-Bonnet F, Gibbons A. 2011a. Recurrence of the multiovulatory response and the incidence of follicular presence in the hormonal treatment with FSHp in ewes. I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal. Viña del Mar. Chile. En: Reproducción en Rumiantes Pequeños. Eds.: Mónica de los Reyes y Mario Duchens. 83-84.
- Bruno-Galarraga M, Cueto M, Pereyra Bonnet F, Escobar L, Gibbons A. 2011b. Efecto de tres tratamientos sucesivos de ovulación múltiple sobre la respuesta ovulatoria y la producción de embriones en ovejas de raza Merino. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. Septiembre 2011. p. 400 (abstr.).
- Carneiro GF. 2007 Reproductive biotechnology in goat: current status. Rev. Bras. Reprod. Anim. 31:267-273.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. Theriogenology 59: 171-188.
- Cognie Y, Chupin D, Saumande J. 1986. The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. Theriogenology 25: 148 (abstr.).
- Cognie Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology 51: 105-116.
- Corteel JM, Lebouef B, Baril G. 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. Small Rum. Res. 1: 19-35.
- Cseh S, Seregi J. 1993. Practical experiences with sheep embryo transfer. Theriogenology 39: 207 (abstr.).
- Chemineau P, Procureur R, Cognie Y, Lefevre PC, Locatelli A, Chupin D. 1986. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. Theriogenology 26: 279-290.
- Chesne P, Colas G, Cognie Y, Guerin Y, Sevellec C. 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection and transfer. Theriogenology 27: 379-387.
- Cueto M, Gibbons A, Escobar L. 2010. Recuperaciones embrionarias sucesivas en ovinos. Segundas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal-INITRA. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Buenos Aires, Argentina. CD.
- Cueto M, Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Silvestre P, González-Bulnes A. 2011. Effects of season and superovulatory treatment on embryo yields in fine-wool merinos maintained under field conditions. Reprod. Dom. Anim. 46: 770-775.
- de la Vega AC, Wilde OR. 1991. Fundamentos biológicos de la criopreservación. Rev. Arg. Prod. Anim. 11 (2): 151-165.
- de Paz P, Sánchez AJ, Fernández, Carbajo M, Dominguez CA, Chamorro CA, Anel L. 1994. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. Theriogenology 42: 327-338.
- Donaldson L. 1984. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryo correlated with total embryos. Theriogenology 21: 517-524.
- Driancourt MA, Lorentz R, Chupin D, Webb R, Wilmut Y. 1988. Survival of ovine embryos stored at 4 °C for 24 hours. Theriogenology 30: 441-446.
- Evans G, Armstrong DT. 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. J. Reprod. Fert. 70: 47-53.
- Evans G, Holland MK, Nottle HB, Sharpe PH, Armstrong DT. 1984. Production of embryos in sheep using FSH preparations and laparoscopic intrauterine insemination. In: Reproduction in

sheep. Eds.: Lindsay DR, Pearce DT. Aust. Acad. Sci. and Aust. Wool Corp. Canberra. pp. 313-315.

- Evans G, Jabbour HN, Moore NW. 1986. Time of intrauterine insemination of superovulated ewes using fresh and frozen semen. 8th Ann. Conf. of Aust. Soc. Reprod. Biol. Brisbane, Australia, 1: 18.

- Fieni F, Buggin M, Tainturier D, Beckers JF, Bach-Lijour B, Bruvas JF, Daubie M. 1990. L'insemination artificielle intra-uterine, transperitoneale chez la chevre. *Recuell de Medicine Veterinaire* 166: 479-484.

- Flores-Foxworth G, Mc Bride BM, Kraemer DC, Nuti LC. 1992. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology* 37: 213 (abstr.).

- Flores-Foxworth G. 2007. Current therapy in large animals. *Theriogenology Chapter 83 - Reproductive Biotechnologies in the Goat*. Eds.: Youngquist RS and Threlfall WR. pp. 603-614.

- Gatica R, Boland MP, Crosby TF, Gordon Y. 1984. Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology* 21: 555-560.

- Gharbi I, Ferrouk M, Dechicha A, Baril G, Beckers JF, Guetarni D. 2012. Follicular status and embryo production in ouled djellal (algeria) ewes breed pretreated with a GnRH agonist. *J. Animal and Veterinary Advances* 11: 791-798.

- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Silvestre P, Cueto M. 2008. Vitricación de embriones ovinos en tips. *Memorias de las Primeras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal-INITRA*. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. 24-26 de septiembre. Buenos Aires, Argentina.

- Gibbons A, Traldi A, Silva ROC, Catto DR, Pugliesi D, Cueto M, Pereyra Bonnet. 2009. Eficiencia reproductiva de embriones caprinos vitrificados en tips de micropipetas. *Memorias del VI Congreso Alepyrcs, XV Congreso Nacional AMTEO, XXIV Congreso Nacional AMPCA*. Querétaro, Mexico (CD-ROM). p. 81.

- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Escobar L, Cueto M. 2010. Eficiencia de un tratamiento de OM con dosis reducida de FSH-P en ovejas Merino. In: *Resúmenes de las Segundas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal*. Buenos Aires. Argentina (CD ROM).

- Gibbons A, Cueto MI, Peryra Bonnet F. 2011. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Rum. Res.* 95: 61-64.

- Goel AK, Tyagi S, Agrawal KP. 1995. Non-surgical collection of embryos from goats. *Indian J. Anim Sci.* 65: 293-296.

- González R, García Vinent JC, Gibbons A, Cueto MI. 1991. Laparoscopic embryo transfer in Merino Sheep in Patagonia (Argentina). *XXIV World Vet. Congress*, Río de Janeiro, Brasil.

- González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A. 2000. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54: 1055-1064.

- Gusmão AL, Silva JC, Bittencourt TCC, Martins LEP, Gordiano HD, Barbosa LP. 2009. Transcervical embryo recovery in Dorper ewes in the Brazilian semi-arid Northeast. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61 (2). Belo Horizonte. Abstr.

- Gusmão AL. 2011. State-of-the-art in the transcervical embryo collection in goats and sheep. *Acta Scientiae Veterinariae* 39: 37-42.
- Green R, Santos B, Sicherle C, Landim-Alvarenga F, Bicudo S. 2009. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reprod. Dom. Anim.* 44: 406-410.
- Heyman Y, Vincent C, Garnier V, Cognie Y. 1987. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Vet. Rec.* 24: 83-85.
- IETS, 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society. IETS, Savoy, IL.
- Ishwar AK, Memon MA. 1996. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rum. Res.* 19: 35-43.
- Hunton JR, Maxwell WMC, Ryan JP. 1985. Effect of addition and removal of glycerol and method of transfer on viability of sheep embryos. *Cong. of Aust. Soc. Reprod. Biol.* 29 (abstr.).
- International Embryo Transfer Society 1990. Manual of the International Embryo Transfer Society. Eds.: Stringfellow DA, Seidel SM. 2nd ed. USA, Champaign. pp. 79.
- Jabbour HN, Ryan JP, Evans G, Maxwell WMC. 1991. Effects of season, GnRH administration and Lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of Merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fert. Dev.* 3: 699-707.
- Le Gal F, Baril G, Vallet JC, Lebouef B. 1993. In vivo and in vitro survival of goat frozen embryos with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology* 40: 771-777.
- Lymberopoulos AG, Amiridis GS, Kthholzer B, Besenfelder U, Christodoulou V, Vainas E, Brem G. 2001. Fertilization and embryo recovery in superovulated Chios ewes after laparoscopic intrauterine insemination. *Theriogenology* 55: 1855-1862.
- Lehloenya KC, Greyling, JPC. 2010. The effect of embryo donor age and parity on the superovulatory response in Boer goat does. *South African J. Anim. Sci.* 40: 65-69.
- Lewalski H, Soonen A, Meinecke-Tillman S, Meinecke B. 1991. Transcervical intrauterine embryo transfer in sheep. 7th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Cambridge 1: 160 (abstr.).
- Li R, Cameron AWN, Batt PA, Trounson AO. 1990. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fert. Dev.* 2: 345-350.
- Lima-Verde JB, Lopes Júnior ES, Teixeira DIA, Paula NRO, Medeiros AA, Rondina D, Freitas VJF. 2003. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *South African J. Anim. Sci.* 33: 127-131.
- Martinez AG, Valcarcel A, Furnus CC, De Matos DG, Iorio G, de las Heras MA. 2006. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Rum. Res.* 63: 288-296.
- Masoudi R, Kohram H, Shahne AZ, Davoud SDMA. 2012 Effect of estradiol and oxytocin on ovine cervical relaxation. *African J. Biotech.* 11: 2803-2806.
- Mayorga I, Mara L, Sanna D, Stelletta C, Morgante M, Casu S, Dattena M. 2011. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology* 75: 1661-1668.
- Mc Kelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25: 855-865.
- Melican D, Gavin W. 2008. Repeat superovulation, non-surgical embryo recovery, and surgical embryo transfer in transgenic dairy goats. *Theriogenology* 69: 197-203.

- Menchaca A, Vilario M, Crispo M, de Castro T, Rubianes E. 2010. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants (Review). *Reprod. Fert. Dev.* 22: 113-118.
- Menchaca A, Vilariño M, Pinczak A, Kmaid S, Saldaña JM. 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72: 477–483.
- Moor RM, Osborn JC, Crosby IM. 1985. Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fert.* 74: 167-172.
- Moore ER. 1980. Procedures and results obtainable in sheep and goats. In: *Current Therapy. Theriogenology*. Eds.: Morrow DA, Saunders WB. pp. 89-95.
- Moore NW, Eppleston J. 1979. Embryo transfer in the Angora goat. *Aust. J. Agric. Res.* 30: 973-981.
- Moore NW, Rowson LEA. 1960. Egg transfer in sheep factors affecting the survival and development of transferred eggs. *J. Reprod. Fert.* 1: 332 (abstr.).
- Mueller J. 1993. Utilización de la inseminación artificial y la superovulación con transferencia de embriones en el mejoramiento genético de ovinos. *Comunicación Técnica del INTA Producción Animal* 323: 1-8.
- Pereira RJTA, Sohnrey B, Holtz W. 1998. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F₂ α and oxytocin. *J. Anim. Sci.* 76: 360-363.
- Quan F, Zhang Z, An Z, Hua S, Zhao X, Zhang Y. 2011. Multiple factors affecting superovulation in Poll Dorset in China. *Reprod. Dom. Anim.* 46: 39-44.
- Remy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumande J, Chupin D, Beckers JF. 1991. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone? *Theriogenology* 36: 389-399.
- Renard JP, Heyman Y, Ozil JP. 1982. Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle methode de decongelation pour le transfert cervical d'embryons conditionnes une seule fois en paillettes. *Ann. Med. Vet.* 126: 22-32.
- Ritar AJ, Bell PD, O'May PJ, Black TM, Jackson RB, Murray N. 1988. Superovulation response and embryo recovery from Cashmere and Angora does after treatment with FSH (Follitropin). 20th Ann. Conf. of Aust. Soc. Reprod. Biol. Newcastle Univ. 29-31 August (abstr.).
- Rowson LEA, Moor RM. 1966. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal. *J. Reprod. Fert.* 11: 207-212.
- Sohnrey SB, Holtz W. 2000. Transcervical embryo collection in Boer goats. *Small Rum. Res.* 36: 195-200.
- Shelton JN, Moore NW. 1966. Survival of fertilized eggs transferred to ewes after progesterone treatment. *J. Reprod. Fert.* 11: 149 (abstr.).
- Shelton JN. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demiembryos. *Theriogenology* 37: 507-514.
- Stringfellow DA, Riddell KP, Zurovac O. 1991. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. *New Zealand Vet. J.* 39:8-17.
- Tervit HR, Goold PG, Mc Kenzie RD, Clarkson DT, Drummonds J. 1984. Embryo transfer in Angora and Saanen goats. *New Zealand Vet. J.* 33: 77-80.

- Tervit HR, Goold PG, Mc Kenzie RD, Clarkson DT. 1983. Techniques and success of embryo transfer in Angora goats. *New Zealand Vet. J.* 31: 67-70.
- Tervit HR, Goold PG. 1984. Deep freezing sheep embryos. *Theriogenology* 21: 268 (abstr.).
- Tervit HR, Havick PG. 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zealand Vet. J.* 24: 138 (abstr.).
- Tervit HR. 1986. Embryo transfer and artificial insemination in Angora goat. *Sem. Mohair Conf. New Zealand*, 12-17.
- Torres S, Cognie Y, Colas G. 1984. Transfert des embryons chez les ovins. IX Journées de la Recherche Ovine et Caprine, Ed. INRA-ITOVIC-SPEOC, Paris. pp. 215-239.
- Torres S, Sevellec C. 1987. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.* 27: 859-863.
- Torres S, Cognie Y, Colas G. 1987. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology* 27: 407-418.
- Traldi AS, Visintin JA, Mizuta K, de la Libera AMP. 1995. Utilização de antiprostaglandínico na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em caprinos. *Proc. of the 11th Brazilian Congress of Animal Reproduction, Belo Horizonte, Brasil*, 244 (abstr.).
- Traldi A, Silva ROC, Catto DR, Pugliesi D, Pereyra Bonnet F, Gibbons A. 2009. Goat embryos survival vitrified in micropipette tips compared to fresh embryos. *Anais del XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. MG: Brasil (CD-ROM). ISSN1984-871. p.* 404.
- Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P. 1999. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 51: 175 (abstr.).
- Trounson AQO, Moore NW. 1974. Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination. *Aust. J. Biol. Sci.* 27: 301-304.
- Tsunoda Y, Sugie T. 1989. Superovulation in non-seasonal Japanese native goats, with special reference to the developmental progression of embryos. *Theriogenology* 31: 991-996.
- Vallet JC, Baril G, Rougier F, Chupin D, Procureur R, Corteel JM. 1987. Feasibility and repeatability of embryo recoveries from dairy goats under laparoscopy. *3rd Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France*, 1: 60 (abstr.).
- Vallet JC, Baril G. 1990. Effect of time of laparoscopic intrauterine insemination in superovulated dairy goats. *6th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France*, 1: 188 (abstr.).
- Vallet JC, Casamitjana P, Brebion P, Perrin J. 1991. Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Recueil de Médecine Veterinaire, Special Reprod. des ruminants* 1: 293-230.
- Walker SK, Smith DH, Seamark RF. 1986. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *J. Reprod. Fert.* 77: 135-142.
- Walker SK, Smith DH, Frenshman A, Ashman RJ, Seamark RF. 1989. The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology* 31: 741-752.
- Warwick BL, Berry RO, Horlachwer WR. 1934. Results of mating rams to Angora females goats. *Proc. Am. Soc. Anim. Prod.* 225 (abstr.).

- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -296 °C. *Science* 178: 411-414.
- Wilmut Y, Rowson L. 1973. Experiments on the low temperature preservations of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM. 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 46: 151-154.
- Winterberger-Torres S, Sevellec C. 1987. Atlas du developement embryonnaire precoce chez les ovins. INRA Station de Physiologie Animale. Jouy en Josas. Publ. Versailles. pp. 51.
- Wolff M, Gibbons A, Cueto M, Willems P, Arrigo J. 1994. Results of artificial insemination with frozen semen in Australian Merino ewes multiovulated with FSHp. IV World Merino Conference. Montevideo, Uruguay. pp. 269 (abstr.).
- Wulster-Radcliffe MC, Costine BA, Lewis GS. 1999. Estradiol-17 β -oxytocin-induced cervical dilation in sheep: Application to transcervical embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 77: 2587-2593.

ANEXOS

Anexo 1. Grados de clasificación de embriones

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

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

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

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

Anexo 2. Medios de congelamiento

Para preparar una solución 1 M de etilenglicol se colocan 5.59 ml en 100 ml de PBS con 20% de suero fetal bovino. Por simple cálculo se obtienen las concentraciones de etilenglicol para las concentraciones 0.5 y 1.5 M.

Para la solución de sucrosa 0.25 M se agregan 8.56 g de sucrosa a 100 ml de PBS con 20% de suero fetal bovino.

Anexo 3. Técnica de vitrificación

(Gibbons y col. 2011)

SOLUCIONES DE VITRIFICACION

SOLUCION 1

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

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 2

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

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 3

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

30 segundos a 25 °C

SOLUCIONES DE DESVITRIFICACION

SOLUCION 1

3.75 ml Solución A + 0.625 ml de Glicerol (12.5%) + 0.625 ml de EG (12.5%) + 0.86 g de Sucrosa (0.50 M)**

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 2

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

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 3

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

5 minutos a 25 °C

SOLUCION 4

5 ml Solución A

2.5 minutos a 25 °C

SOLUCION 5

5 ml Solución A

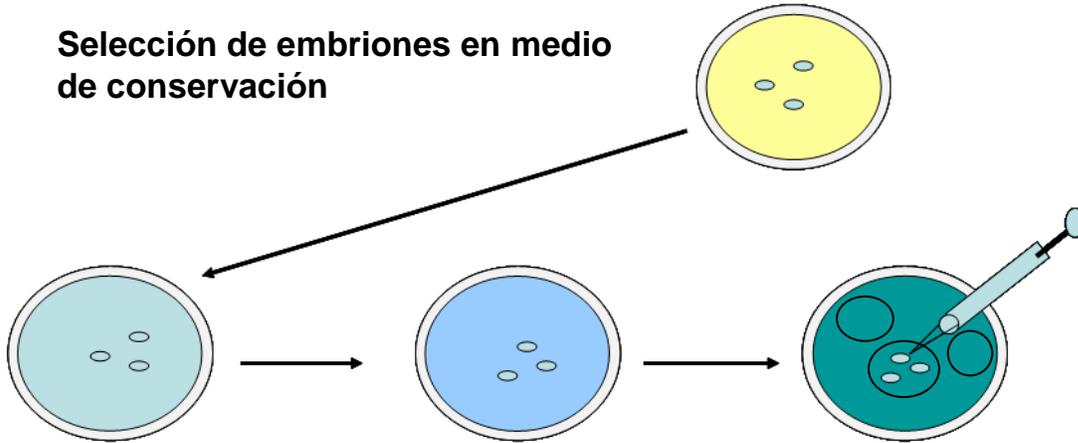
2.5 minutos a 25 °C

***Solución A: 28 ml de PBS + 7 ml de suero fetal bovino (20%)**

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

Vitrificación de Embriones

Selección de embriones en medio de conservación



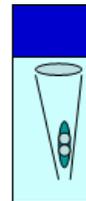
Solución de Equilibramiento 1:
Sl. A + 10% Glicerol
a 25 °C (5 min)

Solución de Equilibramiento 2:
Sl. A + 10% Glicerol +
20% Etilenglicol
a 25 °C (5 min)

Solución de Vitrificación:
Sl. A + 25% Glicerol +
25% Etilenglicol
a 25 °C (30 seg) y
aspiración de
2 a 3 embriones en el
tip con 1.5 µl de medio

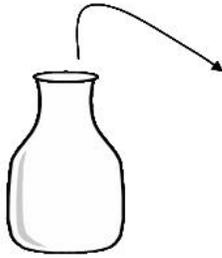


Cryotubo lleno de N₂ líquido



Tip con embriones sumergidos en cryotubo con N₂ líquido

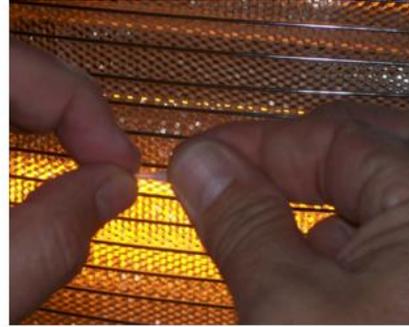
Desvitrificación Embrionaria



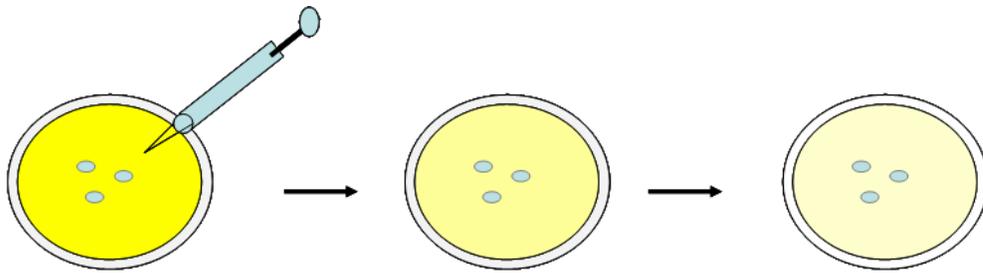
Termo de N₂ líquido



Retiro del tip del
cryotubo con los
embriones vitrificados



Licuefacción del
contenido del tip por
calentamiento a mano
durante 6 segundos

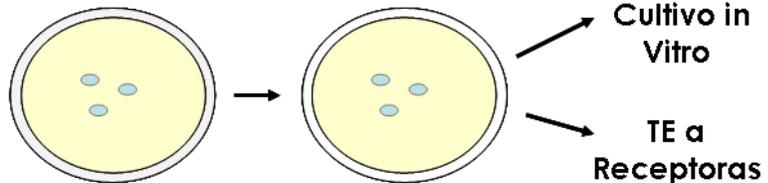


Rehidratación 1:
Sl. A + 12.5% glicerol +
12.5% etilenglicol +
0.5 M Sucrosa (5 min)
a 25 °C

Rehidratación 2:
Sl. A + 0.5 M Sucrosa
(5 min)
a 25 °C

Rehidratación 3:
Sl. A + 0.25 M Sucrosa
(5 min)
a 25 °C

Lavados:
Dos pasajes sucesivos de
los embriones en Sl. A
2.5 min en cada una
a 25 °C



Cultivo in
Vitro

TE a
Receptoras



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

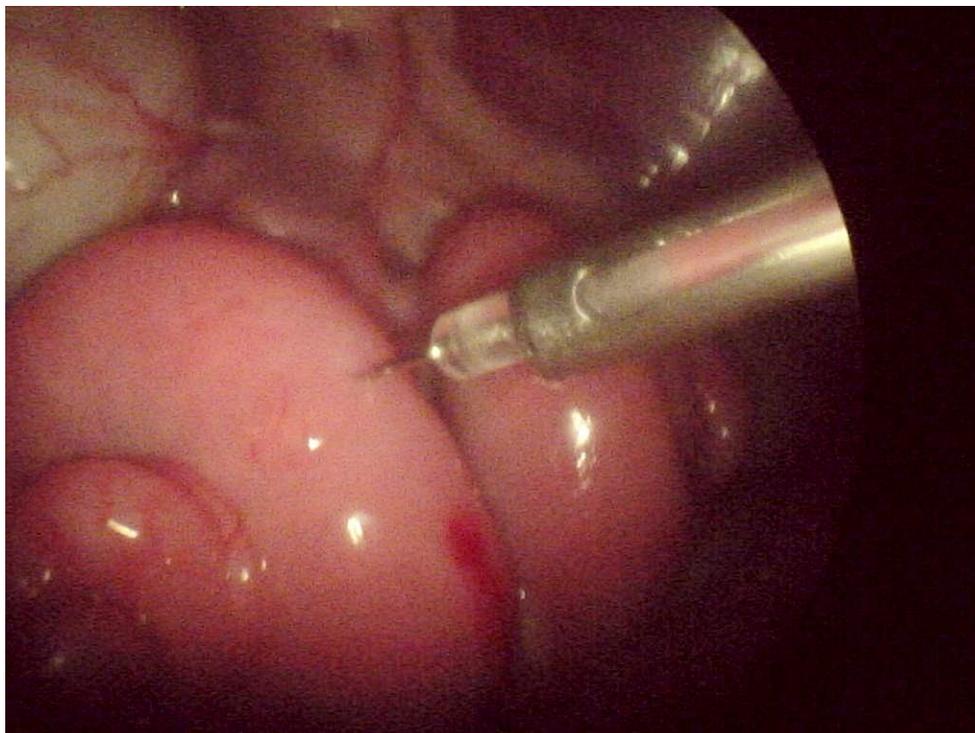


Foto 2. Inseminación artificial intrauterina con semen congelado por laparoscopia en oveja donante.



Foto 3. Punción del cuerno uterino (Tercio proximal) para la siembra semi-quirúrgica de embriones.

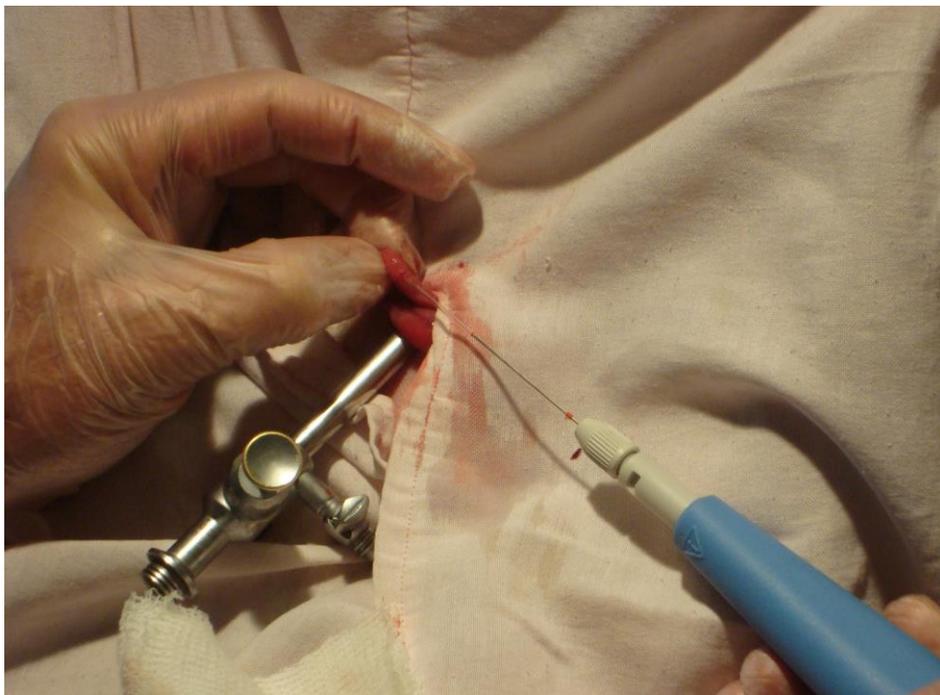


Foto 4. Siembra semi-quirúrgica de embriones con exteriorización del cuerno uterino por pinzamiento.