

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

"UNIDAD LAGUNA"



"BIOTECNOLOGÍA EN EL TRASPLANTE DE EMBRIONES EN OVINOS"

POR:

FRANCISCO JAVIER LUNA PÉREZ

MONOGRAFÍA:

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO
JUNIO2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



BIOTECNOLOGIA EN EL TRASPLANTE DE EMBRIONES EN OVINOS

POR:

FRANCISCO JAVIER LUNA PEREZ

ASESOR PRINCIPAL

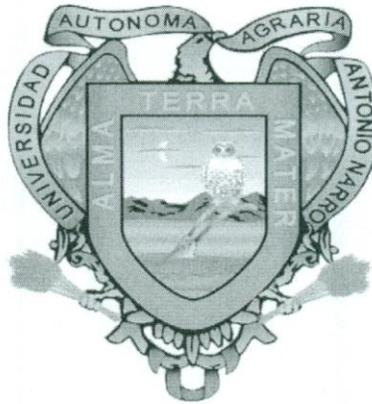

M.C. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

TÓRREON, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



BIOTECNOLOGIA EN EL TRASPLANTE DE EMBRIONES EN OVINOS

POR:

FRANCISCO JAVIER LUNA PEREZ

ASESOR PRINCIPAL



M.C. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TÓRREON, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



BIOTECNOLOGIA EN EL TRASPLANTE DE EMBRIONES EN OVINOS

POR:

**FRANCISCO JAVIER LUNA PEREZ
JURADO**

**M.C. JORGE ITURBIDE RAMIREZ
PRESIDENTE DEL JURADO**

**M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
VOCAL**

**M.V.Z. ESEQUIEL CASTILLO ROMERO
VOCAL**

**M.C. SERGIO BARRAZA ARAIZA
VOCAL SUPLENTE**

**M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO
CORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL**



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por todas las alegrías y tristezas que sobre mí a derramado, así como por darme la oportunidad de terminar con éxito mis estudios a nivel licenciatura.

A MIS PADRES:

Por el apoyo inmenso e incondicional que me brindaron día con día, no importo la distancia pues siempre que necesité de ustedes estuvieron ahí para brindarme sus consejos, su fortaleza, su ánimo y sobre todo su amor.

A MI ALMA TERRA MATER:

Por todos los conocimientos y/o experiencias adquiridos en ella, y por brindarme la oportunidad de superarme humana y profesionalmente.

AL MC. JORGE ITURBIDE:

Por su paciencia, orientación y valiosa participación en la elaboración de este documento.

A MIS AMIGOS:

Por pasar grandes momentos y por darme la oportunidad de ser su amigo. Por alentarme y por sus consejos ya sean buenos o malos, por su compañía y por esos grandes momentos vividos, muy en especial para FRANCISCO FERNAANDO VALERIO Y ESTEFANIA JIMENEZ GOMEZ. Quienes siempre estarán conmigo, dios guie su camino donde quiera que estén.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Sra. Amalia Pérez Rivera

Sr. J. Genaro Luna Jaime

Muchas gracias queridos padres por el apoyo inmenso e incondicional que me brindaron día con día, no importo la distancia pues siempre que necesité de ustedes estuvieron ahí para brindarme sus consejos, su fortaleza, su ánimo y sobre todo su amor. Gracias por creer en mí y en este sueño que un día comenzó desde, gracias por depositar en mi su confianza y por darme la oportunidad de demostrarles que el esfuerzo y los sacrificios realizados durante estos cinco años no fueron en vano y que hoy este sueño es una realidad. Gracias papá y mamá fueron mi motivación y aliento para seguir luchando y no dejarme vencer por el miedo y las adversidades de la vida, sé que nunca terminaría de darle gracias a Dios por haberme enviado con unos padres ejemplares pues gracias a su amor, educación y formación hoy soy un hombre de bien. Siéntanse orgullosos he llegado a la meta gracias a ustedes; las semillas que un día sembraron ya dieron resultados es tiempo de cosechar los frutos.

A MIS HERMANOS

Pablo Iván Luna Pérez

Janeth Luna Pérez

Griselda Luna Pérez

Gracias por su comprensión y amor al compartir momentos de alegría y tristeza, al gran apoyo que me brindan aun estando tan lejos de casa, siempre estaremos unidos en cualquier adversidad que en la vida nos encontremos, que dios los bendiga.

Con cariño, admiración y respeto: Francisco Javier Luna Pérez.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIAS	6
RESUMEN	9
INTRODUCCION	10
OBJETIVOS	12
HISTORIA DEL DESARROLLO OVINO	13
PRINCIPIOS Y CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....	14
VENTAJAS.....	15
DESVENTAJAS	16
IMPORTANCIA DE LAS HEMBRAS DONANTES.....	17
IMPORTANCIA DE LA RECEPTORA	18
FISIOLOGÍA HORMONAL Y SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO.....	19
ESTIMULACIÓN OVÁRICA PARA LA OVULACIÓN MÚLTIPLE.....	20
FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA A LA OVULACIÓN MÚLTIPLE.	21
INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN LAS HEMBRAS RECEPTORAS Y SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO ENTRE DONANTE Y RECEPTORA.....	21
FECUNDACIÓN EN LA HEMBRA DONANTE.	22
COLECTA DE EMBRIONES.....	22
BÚSQUEDA DE EMBRIONES.	24
CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES	24
CONGELAMIENTO DE EMBRIONES.	25
DESCONGELAMIENTO DE EMBRIONES.....	27
CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.	27
TRASPLANTE DE EMBRIONES.	29
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA	32

RESUMEN

La producción ovina en México.
Situación actual.

A pesar de que la producción ovina ocupa uno de los últimos lugares por su impacto económico en la industria pecuaria nacional, es reconocida como una actividad importante dentro del subsector ganadero, por el alto valor que representa al constituir un componente beneficioso para la economía del campesino de escasos recursos y por la gran demanda de sus productos, especialmente entre la población urbana, principalmente en las grandes ciudades como el Distrito Federal y su área conurbana del Estado de México, Guadalajara y Monterrey. Sin embargo, hoy en día la producción ovina, en especial en lo referente a la oferta, sigue dependiendo en gran medida (33%) de la importación, tanto de animales en pie como en canal, principalmente de Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y Chile. (Cuellar A. 2010)

Los primeros trasplantes de embriones en caprinos y ovinos se realizaron hace 50 años (Warwick y col, 1934). A partir de los años 60 se realizaron trabajos en Australia (Moore y Rowson, 1960) y en Nueva Zelanda (Tervit y Havick, 1976), que contribuyeron a precisar las condiciones y las posibilidades del desarrollo de la TE.

Esta técnica ha sido empleada durante los últimos 10 años en Australia y Nueva Zelanda, con el objetivo de incorporar material genético de cabras de Angora, reduciendo los riesgos sanitarios (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

Palabras clave: ovino, trasplante, embriones.

INTRODUCCION

La transferencia de embriones es una biotecnología aplicada para el incremento de la producción animal y la conservación e intercambio de material genético a nivel mundial. Se presentan las metodologías y avances logrados en el desarrollo de la transferencia embrionaria en la especie ovina, que tienden a incrementar la eficiencia reproductiva de esta técnica. (Gibbons A. 2003).

La transferencia de embriones en ovinos es un método de reproducción artificial que está empezando a utilizarse en nuestro país.

El trasplante de embriones es un método de reproducción artificial basado en la transferencia de embriones producidos por una hembra donante (madre genética superior) a hembras receptoras (madres portadoras) que lo gestan hasta su nacimiento. (Fischer A. 2011).

La producción de embriones ha sido propuesta como una metodología tendiente a la preservación de especies en peligro de extinción, que brinda la posibilidad de disponer de bancos genéticos para su conservación y un reaseguro sanitario para evitar la transmisión de enfermedades. A su vez, el incremento en la eficiencia de la producción y congelamiento de embriones podrá ser utilizado para constituir rebaños con el mínimo riesgo de ser portadores de enfermedades y permitir una amplia difusión mundial de animales con alto mérito genético. (Gibbons A. 2003).

El objetivo de esta práctica es contar con animales superiores en menos tiempo. La transferencia de embriones es una

práctica que ayuda a los productores de ovinos a incrementar el número de crías de las hembras de alto valor genético. Con la aplicación de esta tecnología, se aprovecha la gran cantidad de ovocitos que existen en el ovario de una hembra. El trabajo consiste en realizar una estimulación de los ovarios mediante tratamientos hormonales, para que se produzca una ovulación múltiple. De esta forma, los valores medios alcanzan a ser diez veces superiores a la tasa ovulatoria promedio de la raza. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

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

- Aumentar la eficiencia de los programas de núcleos de producción de leche, carne o lana, ya que es posible realizar una estimación del valor genético de las hembras.
- Introducir y difundir rápidamente nuevas razas o genotipos de alto valor productivo. Se reducen los altos costos de producción que se presentan con animales de baja eficiencia productiva. Las características deseables y de alta heredabilidad pueden ser rápidamente multiplicadas. Un ejemplo se presenta con la característica genética del “gen prolífico Booroola” que en la raza Merino ha dado a sus portadores un valor adicional que podría ser rápidamente multiplicado por la TE.
- Incrementar la tasa de mellizos (gemelos idénticos). Al realizar la partición de embriones se logran individuos genéticamente iguales, siendo entonces posible probar la

adaptación de los genotipos idénticos, en situaciones ambientales o de manejo diferentes.

- Conservar razas o especies. La conservación de material genético (embriones congelados) permite el reaseguro en bancos de genes que de otra manera desaparecerían con la especie.
- Difundir material genético de alto valor comercial con facilidad de adaptación ambiental de las crías a diferentes sistemas de producción y manejo.
- Reducir riesgos en la transmisión de enfermedades, debido a que en los primeros estadíos de su desarrollo los embriones presentan una protección natural contra los agentes infecciosos. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

OBJETIVOS

Comprender una serie de técnicas que están permitiendo aumentar la productividad y la tasa de mejoramiento genético de los animales ampliando la eficiencia reproductiva y una calidad superior de sus productos.

HISTORIA DEL DESARROLLO OVINO

Tras un largo periodo de letargo que abarcó todo el siglo ha resurgido en los últimos años el interés por el ovino en México. Por ello el afán, de técnicos y productores, en conocer los orígenes y expansión de la especie; de la maravilla de sus productos, de los distintos genotipos, sean salvajes o domésticos, de las razas y sus variedades. Si una especie animal ha brindado beneficios y satisfactores a la humanidad desde etapas muy tempranas y a lo largo de su historia es el ovino doméstico (*Ovis aries*). Sus fibras y pieles han vestido al hombre durante miles de años, de igual forma su carne y leche han sido parte importante de su dieta. Sus subproductos, entre ellos grasas y excretas, sirven para abonos o para la fabricación de jabón y champú. Su fuerza de trabajo como animal de carga se ha utilizado durante siglos por algunos pueblos asiáticos. Estas virtudes de ser generador de trabajo y riqueza han caracterizado al ovino hasta nuestros días. (Pagés, 2003; Lucas y Arbiza, 2001).

El hombre con el correr de los siglos ha reconocido el valor y utilidad de esta especie y, a través del tiempo, las ovejas han ocupado un lugar preponderante en la tradición y cultura de muchos pueblos. El reconocimiento de las bondades y beneficios que han aportado a la humanidad los ovinos se han manifestado de distintas maneras a través de los siglos y de las distintas culturas.

En México el ovino, comúnmente conocido como borrego, se conoce y explota desde la Colonia. En la actualidad se le asocia, de manera principal en el Altiplano Central, con un plato tradicional denominado barbacoa. Es creencia generalizada que este es el único platillo que se puede guisar con los borregos. Sin embargo, el ovino, es mucho más que esto. (Pagés, 2003; Lucas y Arbiza, 2002; Lucas y Arbiza, 2001).

PRINCIPIOS Y CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

El trabajo consiste en realizar una estimulación de los ovarios mediante tratamientos hormonales, para que se produzca una ovulación múltiple. De esta forma, los valores medios alcanzan a ser diez veces superiores a la tasa ovulatoria promedio de la raza. (Fischer A. 2011).

La elección de las hembras donantes se realizará teniendo en cuenta su valor genético, y en base a los criterios apropiados de mejoramiento de las aptitudes productivas para cada raza. Las condiciones generales de un buen estado reproductivo, sanitario y nutricional son imprescindibles, tanto para las hembras donantes como para las receptoras.

Las hembras deben al menos haber tenido una cría, y se debe considerar un mínimo de 2 meses (ovinos) post-parto antes de comenzar los tratamientos hormonales. Acortar estos tiempos puede significar una pobre fertilidad. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

La producción de embriones permite incorporar hembras como fuente genética a multiplicar en los programas de

mejoramiento. La técnica permite repetir la operación varias veces dentro de una misma estación, incrementando el número de corderos o terneros de una misma donante. El término transferencia de embriones engloba mucho más que la transferencia en sí, incluye la multi o superovulación, la recolección de embriones (Figura 1), corto período de cultivo in vitro, manipulación, congelación y transferencia (Figura 2). Del conocimiento y dominio de cada una de esas tecnologías asociadas dependerá el resultado, además de tener en cuenta otros aspectos como raza donantes de embriones, tipo de servicio, factores ambientales, nutricionales y sanitarios. (Rodríguez M., Vallejo A., Batista P., Espasandin A. 2011).

VENTAJAS

- Incrementa el número de crías/hembra
- Incrementa el mejoramiento genético rápidamente.
- Reduce el intervalo entre generaciones
- Bajo costos de transporte
- Evita problemas sanitarios
- Se reproduce animales en peligro de extinción. (Edwin Mellisho S. 2003).

DESVENTAJAS

- Requiere de conocimientos en técnicas avanzadas
- Requiere investigación en muchas áreas
- Es costoso
- Posible efecto adverso de las hormonas exógenas
- Lesiones al realizar procedimientos quirúrgicos.
(Edwin Mellisho S. 2003).

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

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

9- Clasificación de embriones.

10- Siembra de embriones.

11- Conservación de embriones.
(Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

IMPORTANCIA DE LAS HEMBRAS DONANTES

Las hembras donantes, proceden de rebaños:

Certificados oficialmente libres de *Brucella mellitensis* y ovis, y lengua azul de acuerdo al Código Zoosanitario Internacional. Sin evidencias clínicas ni serológicas de Paratuberculosis, Artritis, Encefalitis Caprina, Maedi-Visna, Enfermedad de Border, Agalaxia Contagiosa a lo menos por 3 años.

En el momento de la recolección, las hembras deben ser sometidas a un examen clínico por el médico veterinario del equipo de recolección el cual deberá certificar que están libres de signos clínicos de enfermedad infecto contagiosa.

El área geográfica de ubicación del rebaño se encuentra libre de enfermedades susceptibles de ser transmitidas por óvulos/embriones, durante los días que preceden a la recolección. (Santiago. 2004).

- Elección hembras de mayor valor genético de la población (élite)
- Buena salud (respuesta tratamiento)

- Buen estado de carnes (no obesas o delgadas)
- Buen historial reproductivo (ciclo estral previo s.o.)
(León Velasco H, Ruiz Hernández H, Villalobos A.2008).

IMPORTANCIA DE LA RECEPTORA

La hembra receptora es la más importante en el proceso de transferencia de embriones frescos o embriones congelados, debido a que ella es la que recibirá los embriones.

La receptora es seleccionada de entre las mejores y se observará que esté bien sanitada, sin ninguna molestia física, enfermedades o aspectos que puedan afectar su maternidad.

Siempre se eligen animales que no sean primerizos; es decir, que ya hayan destetado a una cría. Con ello, se puede evaluar la capacidad maternal o capacidad de criar a un cordero. (Fischer A. 2011).

Elección de hembras fértiles, buenas madres, partos fáciles

No elevado valor genético

Buena salud (libre enfermedades de declaración obligatoria)

Buena condición corporal.

(León Velasco H, Ruiz Hernández H, Villalobos A.2008).

FISIOLOGÍA HORMONAL Y SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO.

Los tratamientos hormonales específicos en hembras donantes y receptoras, se utilizan para la inducción del estro y la ovulación múltiple (hembras donantes), o la ovulación (hembras receptoras) y la sincronización del estro entre ambas. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

La GnRH o gonadoliberina es un decapeptido producido por neuronas secretoras del sistema nervioso central. La secreción de esta hormona está influenciada por condiciones externas (fotoperíodo, feromonas, stress, nutrición) e internas (estrógeno, progesterona). Su acción se ejerce a nivel de las células gonadotróficas de la hipófisis, activando la síntesis y liberación de FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante). Esta hormona ha sido utilizada para lograr la concentración de la ovulación.

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

La progesterona es un esteroide secretado por el cuerpo lúteo del ovario, y en el caso de ocurrir fertilización, por la placenta. Su función es mantener la gestación. Antes de la ovulación, participa con los estrógenos en la manifestación externa del celo. (Gibbons A. 2003).

ESTIMULACIÓN OVÁRICA PARA LA OVULACIÓN MÚLTIPLE.

Mejorar la respuesta superovulatoria con un agonista de la GnRH o un antagonista de la GnRH, (con el fin de aumentar el número de los folículos que son sensibles a la acción de las gonadotropinas - Cognié, 1999) o asociando una pequeña dosis de eCG al tratamiento de FSH, coincidiendo con la retirada de la esponja . (Olivera et al., 2001).

Durante 10 a 12 días se aplican progestágenos contenidos en una esponja que se coloca en la vagina de la oveja para estimular la producción de óvulos por el ovario y que presente el celo o calor.

Al fin de este periodo se puede aplicar gonadotropina de suero de yegua preñada, también llamada gonadotropina coriónica equina (PMSG por sus siglas en inglés) para favorecer que los ovarios produzcan más óvulos y la oveja, potencialmente, más corderos. La dosis (300 mg). (Trejo González A. 2000).

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

Para obtener una mejor respuesta ovulatoria se aconseja administrar LH en forma creciente. Se recomienda una relación FSH/LH de 3:1 (1er a 3er aplicación), 1:1 (4ta aplicación) y 1:2 (5ta aplicación). (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA A LA OVULACIÓN MÚLTIPLE.

La raza es factor de variación, presentándose en las más prolíficas una mayor respuesta a la ovulación múltiple, embriones transferibles y crías nacidas. (Gibbons A. 2003).

La estación sexual también influye sobre el número medio de ovulaciones por hembra ovina, siendo superior en la estación reproductiva con respecto al período de anestro aunque la calidad de los embriones fue superior en la época reproductiva.

La alimentación juega un rol muy importante en la respuesta a los tratamientos hormonales de ovulación múltiple, debido a que se ha demostrado que no solamente afecta la respuesta ovulatoria sino que es posible que se presenten luteólisis prematuras, tanto en estación como en contraestación sexual. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN LAS HEMBRAS RECEPTORAS Y SINCRONIZACIÓN DEL ESTRO ENTRE DONANTE Y RECEPTORA.

Los tratamientos hormonales para inducir la ovulación múltiple (OM) y la transferencia de embriones (TE) permiten utilizar de manera intensiva a las hembras genéticamente superiores, en forma similar al aprovechamiento que se realiza con los machos por medio de la inseminación artificial. (Gibbons A. 2003).

La sincronización de los celos de las hembras receptoras y dadoras es fundamental para lograr la continuación del desarrollo del embrión luego de descongelado. (Rodríguez M., Vallejo A., Batista P., Espasandin A. 2011).

FECUNDACIÓN EN LA HEMBRA DONANTE.

La fecundación en las hembras donantes puede realizarse mediante servicio natural, a corral, o mediante inseminación artificial (IA), con semen fresco o congelado.

El servicio a corral se realiza cada 12 horas, desde el comienzo del celo y hasta su finalización.

En el caso de emplearse la IA, ya sea con semen fresco o congelado, se recomienda el empleo de la técnica laparoscópica, debido a que la deposición del semen en los cuernos uterinos y en proximidad del sitio de fertilización, permite aumentar las tasas de fertilización, así como reducir las dosis de inseminación. (García Cervigón et al., 1995).

COLECTA DE EMBRIONES.

La recolección embrionaria mediante la técnica quirúrgica es el método más utilizado en la especie ovina. Se realiza en el día sexto posterior al inicio del estro, mediante la aplicación de un flujo de arrastre (20 cc), inyectando una solución salina (PBS) con suplementación proteica, en proximal del cuerno uterino y recuperando los embriones mediante una sonda

ubicada en la luz uterina de la unión útero-tubárica. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

La recuperación de los embriones es el día seis post-cubrición. Para ello, se realiza una valoración laparoscópica de la respuesta ovulatoria y se continúa con una laparotomía media ventral, por la que se extraen los cuernos uterinos y se procede a su lavado. Éste se realiza introduciendo una solución fosfato para la recuperación de los embriones. (Trejo González A. 2000).

Las técnicas para la colecta de embriones en los rumiantes menores son:

- **Técnica quirúrgica (laparotomía media).**
- **Técnica no quirúrgica (laparoscopia).**

Estas intervenciones se llevan a cabo bajo anestesia general. Es indispensable que los animales no reciban alimento ni agua, en las 24 horas previas a la operación. Se utiliza un tranquilizante (0.4 cc IM, Xilazina al 2%) y un anestésico (7 mg/kg de peso vivo EV, Thiopental sódico). Para un tiempo prolongado de intervención, se utiliza una anestesia inhalatoria a base de halotano y oxígeno. También es posible realizar una combinación de Xilazina (0,11 mg/kg) y Clorhidrato de ketamina (5.5 mg/kg), suministrando esta última a los 10 minutos de la primera. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

BÚSQUEDA DE EMBRIONES.

El PBS recolectado es vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realiza bajo lupa y con sumo cuidado. Se recomienda efectuar siempre una segunda lectura de la placa. A medida que se identifican los embriones, los mismos son aspirados mediante micropipetas y colocados en una caja de Petri con PBS enriquecido, con suero al 10% o BSA al 4%; a resguardo de la luz y a temperatura de laboratorio. Una vez finalizada la búsqueda, se procede a la clasificación de los embriones. De ser posible es importante utilizar campana y aire filtrado. Cabe recordar que se debe trabajar en condiciones estrictas de esterilidad. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES

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. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

CONGELAMIENTO DE EMBRIONES.

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

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

El tiempo entre colecta y congelamiento no debe superar los 40 minutos. 23

El descenso de temperatura se realiza a razón de 1°C a 3°C por minuto hasta -7°C. A los 30 segundos de permanencia en esta temperatura, se procede a realizar el seeding (inducción a la cristalización). Posteriormente, la temperatura se mantiene a -7°C durante 10 minutos (tiempo de equilibramiento), al término de los cuales, se continúa el descenso térmico a razón de 0.3°C por minuto hasta -35°C. El tiempo de estabilización a -35°C es de 15 minutos. Luego, las pajuelas se transfieren al termo de nitrógeno líquido y se sumergen en este medio a -196°C.

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

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

DESCONGELAMIENTO DE EMBRIONES

Este trabajo de descongelamiento se realiza minuciosamente, a una temperatura predeterminada, de acuerdo a los datos enviados por la central de la que se adquirió la genética.

Luego, los embriones pasan a un medio de rehidratación o un medio directo, dependiendo de la forma en la que es congelado. Se evalúa si la categoría del embrión llegó al establecimiento con la misma fecha de desarrollo que envían las centrales. Posteriormente, se preparan individualmente las receptoras, teniendo en cuenta las que serán transferidas, de acuerdo con su dato o fecha de entrada en celo. Una vez terminadas las tareas de laboratorio, es posible preparar a las receptoras para la inoculación. (Fischer A. 2011).

CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.

La congelación de embriones le da así a la TE el segundo valor de mayor importancia en su aplicación (Mapletoft, 1995). Los embriones producidos *in vitro* son más sensibles y por lo tanto mucho menos viables, después de la congelación/descongelación. Otro de los mayores progresos lo constituyó la posibilidad de crioconservar ovocitos, la cual se encuentra aun en pleno desarrollo. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido

Los primeros trabajos de conservación de embriones a bajas temperaturas fueron realizados a mediados del presente siglo por Chang. En animales domésticos, los primeros resultados se publican en la década del 70 (Whittingham y col, 1972; Wilmut y Rowson, 1973). Las técnicas de congelamiento para las especies de referencia se basaron en los trabajos realizados por Whittingham y col. (1972). En 1976 se publicaron los primeros trabajos en caprinos (Bilton y Moore, 1976) y en ovinos (Willadsen y col, 1976).

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

El procedimiento consiste en someter las células embrionarias a cambios osmóticos y a la incorporación de medios crioprotectores. Estos compuestos (polialcoholes) son capaces de penetrar en las células por difusión simple y su función es retardar la formación de los cristales de agua por medio del descenso del punto de congelación. El medio que contiene los embriones (extracelular) es más rico en agua que el medio intracelular. Por lo tanto, al comienzo del congelamiento, la formación de los primeros cristales de hielo se produce en el medio extracelular, generando la salida de agua intracelular, por difusión, hacia el exterior, y disminuyendo la formación de hielo intracelular. Los tiempos y la velocidad del proceso de congelamiento determinan la futura viabilidad del embrión. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995).

TRASPLANTE DE EMBRIONES.

La siembra de embriones requiere de hembras receptoras, sincronizadas en su ciclo estral, en coincidencia con la edad del embrión que les es transferido. En referencia a la edad de las hembras receptoras se ha determinado una mayor eficiencia cuando se emplean hembras jóvenes. Para incrementar la sobrevivencia embrionaria, se recomienda transferir dos embriones por receptora lo más rápido posible y no superar las dos horas entre la recuperación y la siembra. La transferencia se realiza en el tercio superior del cuerno uterino, próximo a la unión utero-tubárica. Es recomendable realizar una observación laparoscópica de los ovarios para determinar si el desarrollo del cuerpo lúteo se corresponde con el día del ciclo estral y rechazar las receptoras con quistes foliculares. (Gibbons A. 2003).

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

Si se trata de embriones previamente congelados, el tiempo entre descongelamiento y siembra se reduce a 20 o 30 minutos.

El sitio habitual de siembra de los embriones es el cuerno ipsilateral del ovario con cuerpo lúteo.

Los 2 métodos más utilizados en la siembra de embriones son el quirúrgico, o no quirúrgico por laparoscopia (González y col, 1991a). En ambos casos se procede a realizar una punción en la cara dorsal del cuerno uterino y en su tercio superior. Mediante una micropipeta, se deposita el embrión en la luz uterina. (Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995

Para llevar a cabo la siembra de embriones, es necesario contar con un espacio cerrado, donde no ingrese viento o polvo, que pueda causar el ingreso de algún agente infeccioso. Puede usarse la camilla utilizada en laparoscopia para transportar a la hembra y efectuar la operación. Primeramente, se adormece a la hembra y se realiza una depilación para quitar toda la lana. Debe quedar únicamente la piel y se desinfecta el sitio en el que se va a explorar.

Luego, se procede a realizar una punción de la cara dorsal del cuerno uterino y en su tercio superior. Mediante una micropipeta, se deposita el embrión en la luz uterina. La incisión es de 3 cm en la línea media abdominal, en la que mediante una pinza se exterioriza el cuerpo uterino para la transferencia embrionaria. Una vez hecha la siembra, se sutura la parte muscular y la piel donde se ejecutó la incisión, y se coloca un antibiótico, seguido de curabichera, para evitar molestias en los puntos tocados. Por último, la receptora vuelve a un corral, en el que recibirá alimento y agua, con todas las comodidades. (Fischer A. 2011.)

CONCLUSIONES

El trasplante de embriones comprende una serie de biotecnias que están permitiendo aumentar la productividad y la tasa de mejoramiento genético de los animales ampliando la eficiencia reproductiva y una calidad superior de sus productos.

Con estas biotecnias es posible:

1. Mejorar la producción del sector ganadero.
2. Conservar especies en peligro de extinción.
3. Incrementar la multiplicación y transporte de material genético.
4. Conservar recursos genéticos únicos que puedan disponerse con relativa facilidad para su posible utilización futura.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cuellar A. 2010. La producción ovina en México. En <http://iberovinos.com/iberovinos/images/stories/cyted/Archivos-Sanidad/La-produccion-ovina-en-Mexico/La-produccion-ovina-en-Mexico.pdf> (consultado el 5 de junio de 2013).
- 2.- Folch J., Olivera J., Aguilar B., Alabart J.L., Sanchez P., Echegoyen E., Cocero M.J., 2000. Resultados obtenidos en la transferencia de embriones dentro del Programa Genético de la U.P.R.A. Carnes Oviaragón. XXV Jornadas Científicas y IV Internacionales de la SEOC. Producción Ovina y Caprina N° XXV, SEOC, 559-561.
- 3.- Baril G. y Brebion P.1995. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. En <http://books.google.com.mx/books?id=slkA2pHe1ywC&pg=PA97&lpg=PA97&dq=trasplante+de+embriones&source=bl&ots=BFLDUCdlQI&sig=K9TunA5DewfG0RpwkBfIGRgbF3k&hl=es&sa=X&ei=Wbm4UfjqKoioyAHLs4DYCw&sqj=2&ved=0CHIQ6AEwCw> (consultado el 5 de junio de 2013).
- 4.- Transferencia de embriones. <http://www.uclm.es/profesorado/produccionanimal/BasesPA/Reproduccion/TE.pdf> (consultado el 5 de junio 2013).
- 5.- Fischer A. 2011. Transferencia de embriones en ovinos. En <http://www.abc.com.py/articulos/transferencia-de-embriones-en-ovinos-324992.html> (consultado el 5 de junio 2013).
- 6.- Gibbons A. 2003. Transferencia de Embriones en Ovinos. En <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210927.pdf> (consultado el 6 de junio 2013)

- 7.- León Velasco H, Ruiz Hernández H, Villalobos A.2008. Manual de transferencia de embriones en ovinos. En http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Chiapas/52chiapas.pdf (consultado el 6 de junio 2013)
- 8.-<http://www.uclm.es/profesorado/produccionanimal/BasesPA/Reproduccion/TE.pdf> (consultado el 7 de junio 2013)
- 9.- Edwin Mellisho S. 2003. Biotecnología reproductiva. En http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/E%20Mellisho-Biotecnologia%20animal-URPjun07.pdf (consultado el 7 de junio 2013)
- 10.- García Cervigón, M.1; Alcaide, V. Manso, A. García Fernández, M. ; Moyano J.C.; Folch J.; Cocero M.J.; Pérez guzmán, M.D. 1995. La técnica de transferencia de embriones dentro del esquema de selección de la raza ovina manchega.
- 11.- Rodríguez M., Vallejo A., Batista P., Espasandín A. 2011. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. En http://www.eemac.edu.uy/cangue/joomdocs/cangue031_rodri quez.pdf (consultado el 8 de junio 2013)

- 12.- Folch J., Alabart J. L. 2000. Tecnología en reproducción ovina. En <http://www.aleprycs.net/documents/21709/28520/TECNOLOG%C3%8DA+EN+REPRODUCCI%C3%93N+OVINA.pdf> (consultado el 10 de junio 2013)
- 13.- <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1998/vm982c.pdf> (consultado el 10 de junio 2013)
- 14.- Trejo González A. 2000. Inducción y sincronización de celos por medios hormonales, de ovejas. <http://www.asmexcriadoresdeovinos.org/sistema/pdf/reproduccion/induccionsincronizaciondecelos.pdf> (consultado el 10 de junio 2013)
- 15.- Córdova I. A., Ruiz G. L1., Saltijeral J.01 .J.F., Pérez G.T., y Degefa D.1999. Inducción and Synchronization of Heat in Creole Egea Seansonal Anestrus Whith Impregnate Vaginal Sponge Impregnate in FGA and injectable PMSG, Arch zotec. Numero 48, pp 437-440.
- 16.- Santiago. 2004. Fija Exigencias Sanitarias para la Internacion de Ovulos/Embriones Ovinos y Caprinos a chile. En. http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/EMB_OVINOS_CAPRINOS_RES_2212_02.PDF (consultado el 6 de junio 2013)
17. - Gibbons A.E.; Cueto M.I.1995. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. En <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210335.pdf> (consultado el 5 de junio 2013)