



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**TEXTO PROGRAMADO DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA
EN BOVINOS.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

OLGA LETICIA CEDILLO ACOSTA

ASESOR: M.V.Z. ARTURO A. TREJO GONZALEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Pag.

Cuestionario General.	
Introducción.	
1.- HIPEROVULACION Y SINCRONIZACION. Cuestionario.	6
2.- METODOS DE RECOLECCION DE EMBRIONES. Método Quirúrgico. Método No Quirúrgico. Cuestionario.	12
3.- EVALUACION DE LOS EMBRIONES. Cuestionario.	24
4.- TIEMPO Y TECNICAS DE TRANSFERENCIA. Cuestionario.	34
5.- CONSERVACION DE EMBRIONES. Medio de Conservación y Cultivo. Conservación entre 0° y 37°C. Congelación de embriones. Cuestionario.	42
6.- IMPORTANCIA ECONOMICA. EVALUACION FINAL.	50 56
Respuestas a los Cuestionarios.	

CUESTIONARIO GENERAL

Lee cuidadosamente estas preguntas y compara tus respuestas con las de la página 1; si tus respuestas fueron --- acertadas no es necesario que leas este material, pero si no lo fueron, pasa a la Introducción.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Qué es la transferencia de embriones?
- 2.- ¿Qué usos se le pueden dar y cuáles son sus ventajas?
- 3.- ¿Qué métodos de hiperovulación conoces?
- 4.- ¿Qué métodos de sincronización del estró conoces?
- 5.- ¿Qué tipo de inseminación usarías?
- 6.- ¿Qué es la recolección de embriones?
- 7.- ¿Qué tipos de recolección conoces, -- descríbelos brevemente?
- 8.- ¿Qué características debe tener el medio para extraer los embriones?
- 9.- ¿Qué características se toman en cuenta para la evaluación de los cigotos?
- 10.- ¿En qué tiempo se realiza la transferencia?
- 11.- ¿Cuáles son los métodos de transferencia?
- 12.- ¿Cuánto tiempo se puede conservar un -- embrión?
- 13.- ¿Cuál es la importancia económica de la transferencia embrionaria?
- 14.- ¿Qué características debe tener la donadora?
- 15.- ¿Qué características debe tener la receptora?

INTRODUCCION

Los mamíferos al nacer tienen miles de ovocitos, en la vaca se calculan alrededor de 133,000, es decir, se tienen suficientes ovocitos para producir óvulos durante toda la vida, sin embargo, sólo algunos alcanzan la madurez, y de éstos sólo seis u ocho llegan a ser fecundados, y a formar un producto viable en la vida reproductiva.

La posibilidad de estimular la maduración de los ovocitos para obtener un mayor número de óvulos de un animal, fue demostrada en 1927 por Engle, que experimentó en ratones; y Casida y sus colaboradores la aplicaron a la vaca en 1940, esta técnica se llamó hiperovulación.

Esta técnica por sí sola no nos ayuda mucho, ya que cada vaca tiene espacio para gestar sólo uno o dos productos, combinando la técnica de hiperovulación y la de transferencia de embriones, podemos aprovechar el potencial genético de las hembras obteniendo un número mayor de productos de cada donadora.

Para que esto sea posible, hay que provocar la hiperovulación con hormonas exógenas, después se fecundan, y algunos días más tarde son extraídos para ser implantados en otra vaca, que se debe encontrar en el mismo momento del ciclo estral, pero que no ha sido fecundada, para llevar a término la gestación.

Esta técnica nos da un aprovechamiento de la calidad genética de la hembra, representando así un paralelo de lo que es la inseminación artificial en el macho, y juntos ofrecen un camino más rápido que los programas de cruzamiento convencionales para multiplicar a los animales de características deseables o para obtener razas puras.

En la actualidad la técnica es utilizada en muchos países como Inglaterra, Australia, Canadá, Nueva Zelandia, Estados Unidos y México entre otros.

Al principio la técnica de recolección y transferencia fue por métodos quirúrgicos; como su costo es elevado, los riesgos que se corren durante la intervención y las complicaciones posoperatorias son muchas, se ha optado por desarrollar y mejorar técnicas de recolección no quirúrgicas.

A través de la técnica de transferencia de embriones -- es posible aumentar el número de vacas con características específicas, y por medio de una selección intensiva se influye el mérito genético del hato a través de sus hijas.

Por ejemplo, para incrementar la producción de leche de un hato, se seleccionan las vacas genéticamente superiores -- como donadoras y las menos productivas como receptoras, con la hiperovulación es posible utilizar un número pequeño de vacas superiores y se cruza con un toro que es superior y -- probado genéticamente, los embriones son transferidos a las vacas menos productivas, y así se incrementa el "stock" local más rápidamente que usando sólo inseminación artificial.

También se puede aumentar el número de animales de razas exóticas, ya que la importación de éstos es cara y problemática y los animales no siempre se adaptan al nuevo clima, así teniendo un número de hembras de raza, se reproducen transfiriendo los embriones a vacas del lugar, de esta manera es posible que las crías se adapten fácilmente y se aumenta la resistencia a las enfermedades.

Haciendo hiperovular a hembras prepubes y transfiriendo a vacas maduras es posible reducir el intervalo entre generaciones, por este medio se han conseguido becerros de -- hembras prepubes, pero la recolección así como la fertili-

dad son aún muy pobres.

También es posible aumentar el número de partos gemelares ya sea introduciendo un embrión en cada cuerno durante la transferencia o también depositando un embrión en el cuerno contrario al que presenta la ovulación, siete días después de la inseminación normal de la vaca. Por este método se puede incrementar la producción de carne; un factor limitante para la utilización de este método en ganado lechero, es la gran incidencia de freemartinismo cuando los productos son de diferente sexo.

Una posibilidad de gran aplicación en la producción animal es la habilidad para detectar los sexos de los embriones transferidos, permitiendo al granjero seleccionar entre machos o hembras y se elimina el problema del freemartinismo. El sexado de los embriones se puede lograr por tres métodos:

- a) Identificando la cromatina sexual.
- b) Por el análisis del cariotipo.
- c) Detectando el antígeno H-V.

El desarrollo de la tecnología del congelamiento de embriones tiene ventajas como el transporte internacional y la conservación de embriones hasta que la vaca receptora esté en la mejor disposición de recibirlo, evitando el problema de la sincronización.

Otra ventaja que puede tener, pero falta perfeccionar la técnica, es la producción de gemelos idénticos, el valor de éstos en los estudios científicos es muy grande y por medios naturales son muy escasos; por medio de la transferencia de embriones se pueden lograr gemelos homocigotos. Ya se ha logrado obtener hasta cuádruples idénticos por esta técnica, lo que se logra separando los blastómeros por microcirugía, cada blastómero separado se transfiere a la zona pelúci

da de un cigoto al que previamente se le quitó el núcleo, a estas células se les incuba hasta que se desarrollan como -- embriones individuales y luego se transfieren a una receptora por embrión para que la gestación llegue a término.

Otra posibilidad abierta al futuro, es la producción de copias idénticas de un animal, a esta técnica se le llama -- clonación, es posible por la inserción del núcleo de una célula somática, a un embrión fertilizado al cual se le destruyó el núcleo.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- JILLELLA D., (1982). Embryo Transfer Technology and its application in developing countries. Food and Agricultural Organization of the --- United Nations (FAO).
- 2.- PINEDA M.H., and Bowen R.A., (1980). Embryo - Transfer in Veterinary Endocrinology and Re-- production. 3th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.
- 3.- SUGIE T., Seidel G.E., and Hafez E.S.E., (1980). Embryo Transfer in Reproduction in Farm Ani-- mals. 4th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.

1.- HIPEROVULACION Y SINCRONIZACION.

La hiperovulación es el incremento de la respuesta ovulatoria natural, producida por el uso de hormonas exógenas. La respuesta al tratamiento de hiperovulación tiene grandes variaciones entre animales de la misma especie. Los factores que influyen en la respuesta ovulatoria son: La edad, la talla corporal, el peso, el estado nutricional, la etapa del ciclo estral cuando se inicia el tratamiento, el clima y la estación del año, así como la dosis, la potencia, la pureza y calidad de las preparaciones de gonadotropinas disponibles en el mercado, también influye la especie de la cual se extraen estas hormonas.

Las gonadotropinas que se usan para estimular el crecimiento folicular y la ovulación son: Gonadotropina del Suero de Yegua Preñada (PMSG), Hormona Folículo Estimulante (FSH), parcialmente purificada y Extracto Pituitario que contiene FSH y Hormona Luteinizante (LH). Para controlar el tiempo de ovulación se puede administrar LH, gonadotropinas con LH o similares como Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) o bien prostaglandinas como $\text{PGF}_2\alpha$ para que produzcan luteolisis.

GONADOTROPINA DEL SUERO DE YEGUA PREÑADA (PMSG). Esta gonadotropina está presente en la placenta de la yegua, pero puede obtenerse del suero de las yeguas preñadas. La dosis usual para hiperovular a la vaca varía de 1500 a 3000 U.I., dependiendo de la edad y talla del animal, se administra por vía intramuscular o subcutánea y como su vida media es larga puede usarse en una sola dosis. Tiene la desventaja de formar anticuerpos en la donadora y disminuir la respuesta ovulatoria en tratamientos subsecuentes, otra desventaja es la formación de quistes ováricos.

HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH). Es una hormona de -

la hipófisis anterior, se obtiene generalmente de cerdos, -- ovinos y caballos; la dosis media para vacas es de 30 a 50 mg. aplicados dos veces al día por cinco días ya sea en dosis -- constantes o decrecientes, se puede aplicar por vía subcutánea o intramuscular. La vida media en el organismo es corta por lo que se aplica dos veces al día. Una ventaja de esta -- hormona es que no forma anticuerpos por lo que se puede aplicar en repetidas ocasiones para provocar hiperovulación. Se puede aplicar en combinación con LH en proporción de 5:1 y -- se reportan más ovulaciones, embriones recobrados y gestaciones.

Otras hormonas que se usan en combinación con las hormonas hiperovulatorias son:

GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG). Que sirve para -- sincronizar la ovulación, al aparecer la tasa ovulatoria es mayor y ayuda al problema de detección del estro, se usa en dosis de 2500 a 5000 U.I., se administra por vía intravenosa y se recomienda en la fase folicular. El estro se espera de 24 a 48 horas.

FACTOR LIBERADOR DE GONADOTROPINAS. Es una hormona sintética que se usa en lugar de HCG, se recomiendan 100 a 200 mg. por vía intravenosa o intramuscular en el tiempo de la -- ovulación.

ESTRADIOL 17 β . Se usa para eliminar el problema de --- anestro y de estros silenciosos, se aplican 10 mg. un día antes o el día que se espera el estro. Se pueden aplicar dosis pequeñas 400 g. con HCG o GnRH antes del estro para incrementar la tasa ovulatoria.

PROSTAGLANDINAS. Son un potente compuesto luteolítico, ayuda a la respuesta ovulatoria y a obtener un estro en tiempo fijo, también a precisar la sincronización entre las donas

donoras y receptoras, se pueden utilizar prostaglandinas naturales $\text{PGF}_2\alpha$ y Dinoprostroretanina o bien sintéticos como Cloprostenol. Para las formas naturales se usan dosis de 25 a 30 mg. y en las sintéticas de 500 mg. Se administran a la donadora entre las 48 y 72 horas después de que se inicia el tratamiento hiperovulatorio y a las receptoras para sincronizarlas de 12 a 18 horas antes que a la donadora, esto se debe a que la donadora responde más rápidamente por que está bajo la influencia de drogas hiperovulatorias.

El primer método para producir hiperovulación fue la administración de 1500 U.I., de PMSG por vía intramuscular el día 16 del ciclo estral y el estro aparece normalmente el día 21 del ciclo. Como algunas veces se presentan ovulaciones silenciosas, fallas en la fertilización y quistes foliculares, se recomienda el uso de prostaglandinas.

Cuando se usan prostaglandinas se recomienda aplicar -- 1500 U.I., de PMSG por vía intramuscular en una sola dosis - entre el día 8 y 14 del ciclo estral, seguida de la administración de 25 a 30 mg. de PGF_2 alfa por vía intramuscular entre las 48 y 72 horas después de la PMSG.

La sincronización entre donadora y las receptoras se logra administrando PGF_2 alfa en la receptora en la misma dosis que la donadora pero entre las 12 y 18 horas antes que a las donadoras.

Para el tratamiento de FSH, se aplica entre el día 8 y 14 del ciclo estral 5 mg. de FSH como dosis inicial y se disminuye 1 mg. diario por cinco días. Las prostaglandinas se aplican en el tercer día del que se empezó el tratamiento, y se sincroniza a las receptoras, con 30 mg. de $\text{PGF}_2\alpha$ de 12 a 18 horas antes que las donadoras.

La máxima tasa ovulatoria se presenta cuando el trata--

miento es iniciado en los días 9, 10 u 11 del ciclo, al haber mayor respuesta ovulatoria, hay más embriones recobrados por donadora, menos quistes ováricos y una precisa sincronización del estro.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- JILLELLA D., (1982). Embryo Transfer Tecnology and its application in developing countries. Food and Agricultural Organization of the -- United Nations (FAO).
- 2.- PINEDA M.H., and Bower R.A., (1980). Embryo - Transfer in Veterinary Endocrinology and Re-- production. 3th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.
- 3.- SUGIE T., Seidel G.E., and Hafez E.S.E., (1980). Embryo Transfer in Reproduction in Farm Ani-- mals. 4th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.

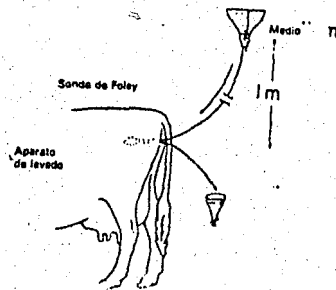
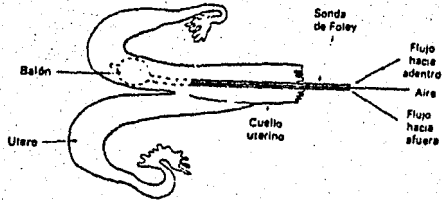
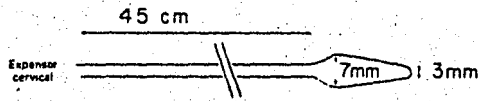
Después de leer el Capítulo 1 responde este cuestionario y compara tus respuestas con las de la página V; Si acertaste, sigue adelante, si fallaste vuelve a leer el capítulo 1.

CUESTIONARIO No. 1

HIPEROVULACION Y SINCRONIZACION

- 1.- ¿Cómo defines hiperovulación?
- 2.- ¿Qué hormonas se usan en la hiperovulación?
- 3.- ¿Cómo se controla el tiempo de ovulación, y cómo se llama a este método?
- 4.- ¿En qué día del ciclo aplicas PMSG sola?
- 5.- ¿Qué dosis se usa generalmente?
- 6.- ¿En qué dosis y vía aplicas $\text{PgF}_2\alpha$?
- 7.- ¿Cómo sincronizas a las receptoras con $\text{PGF}_2\alpha$?
- 8.- ¿Cuál es el mejor día para empezar el tratamiento con $\text{PGF}_2\alpha$?

FIGURA 2.3. RECOLECCION NO QUIRURGICA DE OVULOS BOVINOS USANDO UN DILATADOR CERVICAL Y UN CATETER FOLEY. 11



TOMADO DE: Sugie T., Seidel G.E., y Hafez E.S.E., 1980.

2.- METODOS DE RECOLECCION DE EMBRIONES

La recolección de embriones se puede lograr por varios métodos, uno de ellos es el sacrificio de las hembras donadoras, otro es la extracción de los órganos reproductivos de manera definitiva, el tercero se logra por el lavado de los órganos empleando cirugía y el último y más recomendable es haciendo el lavado de órganos "in situ" o sea sin emplear -- cirugía.

El sacrificio y la extracción definitiva de los órganos son métodos que no se recomiendan porque no se podrá utilizar al animal donador en otras ocasiones, además resulta poco -- práctico y muy costoso. El método de recolección quirúrgico es costoso pero tiene la ventaja de que el animal donador se puede utilizar para extracciones posteriores. Otra desventaja es que se tiene que hacer bajo anestesia general lo cual implica el riesgo de perder al animal; es difícil de realizar en granjas porque deben tenerse estrictas medidas de higiene y un lugar especial para hacer la cirugía, también disminuye la fertilidad por la formación de adherencias que suceden aún en las cirugías que se realizan con el mayor cuidado.

Con el método de recolección no quirúrgico se superan muchas de estas desventajas, pero el método hasta ahora tiene índices de recolección menores que los que se logran con el método quirúrgico; aún así en el más recomendable y sobre el que se trabaja para lograr perfeccionarlo.

METODO QUIRURGICO

Para extraer los óvulos se recomienda hacerlo después del día 5 a partir del estro, cuando los óvulos ya se encuentran en el cuerno uterino, se puede realizar antes pero los índices de recolección son menores.

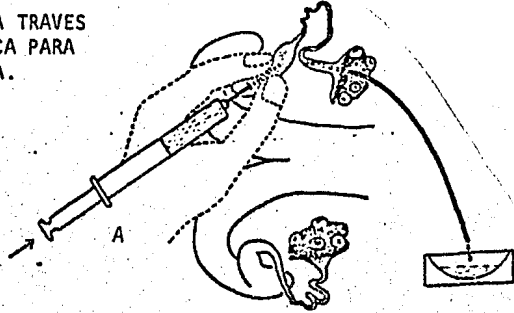
Para la operación se retira el agua y el alimento de 24 a 36 horas antes de la cirugía. El día que se realiza la cirugía se induce la anestesia por medio de un barbitúrico intravenoso manteniéndola con intubación con gas halotane y oxígeno. El área media anterior a la ubre se debe lavar, rasurar y desinfectar, para hacer una insición de 15 cm. aproximadamente, dependiendo de la talla del animal, se expone el útero y los óvarios, y se obstruye el útero a la altura de la bifurcación de los cuernos del útero. La introducción del medio para extraer los embriones se hace por la fimbria con la ayuda de una jeringa, extrayéndolo por la pared del cuerno poco antes del lugar de la obstrucción con la ayuda de un tubo delgado o una aguja depositándolo en pequeñas cajas de vidrio que se pueden utilizar para la observación al microscopio. El método se puede hacer en sentido contrario cuando los embriones se encuentran en el oviducto. En cada infusión se deben introducir de 5 a 20 ml. de medio, y se debe repetir esta operación hasta completar 100 ml. dependiendo de la talla del útero, la operación debe realizarse también en el cuerno contrario, en cada introducción de líquido se debe manejar cuidadosamente el útero a fin de desprender y extraer todos los embriones presentes. Siempre que se realice se debe tener cuidado de introducir la aguja en el lumen del órgano atravesando todo el endometrio (Fig. 2.1.).

Después de recolectar los embriones de ambos cuernos, el útero y los ovarios son lavados con suero salino fisiológico con heparina y antibióticos, para retornarse a su lugar en la cavidad abdominal para cerrar la incisión.

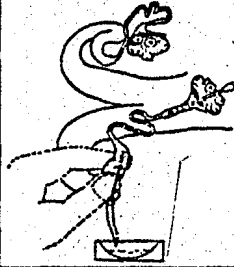
La respuesta ovárica debe ser observada para saber si se recolectan todos los embriones. No siempre se recolectan todos los embriones esto es debido a que con el tratamiento hiperovulatorio el ovario alcanza un tamaño tal que la fim-

FIGURA 2.1. TECNICA DE RECOLECCION DE EMBRIONES CON EL METODO QUIRURGICO.

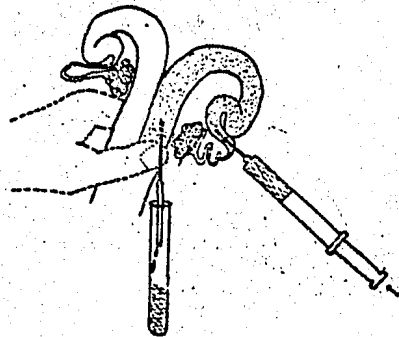
A) INTRODUCIENDO EL MEDIO A TRAVES DE LA UNION UTEROTUBARICA PARA EXTRAERLO POR LA FIMBRIA.



B) INTRODUCIENDO EL MEDIO POR LA FIMBRIA PARA EXTRAERLO POR LA UNION UTERO TUBARICA.



C) INTRODUCIENDO EL LIQUIDO POR LA UNION UTEROTUBARICA PARA EXTRAERLO POR LA BASE DEL CUERNO UTERINO.



TOMADO DE: Sugie T., Seidel G.E., y Hafez E.S.E., 1980.

bría es incapaz de captar todos los óvulos, otra razón es que se produzca crecimiento folicular anovulatorio o bien que falle la técnica de recolección.

El medio que se usa generalmente es el cultivo celular - 199 o bien Dulbecco salino fosfotado y buferado a los que se les puede añadir suero fetal bovino del 10 al 20% para proveerlo de proteínas y se debe de mantener a 37°C tanto antes como después de la extracción. En la tabla (2.1.) damos la composición del medio.

Las desventajas que tiene este método son el alto costo, la formación de adherencias alrededor de la fimbria y el oviducto, las cuales disminuyen la eficiencia reproductiva de la vaca, el riesgo de muerte que se corre siempre con la inducción de la anestesia general, y las complicaciones postoperatorias que pueden ser muchas.

Tomando en cuenta todas estas desventajas, se ha optado en los últimos años por desarrollar métodos no quirúrgicos -- que resulten menos costosos y más prácticos. Con los nuevos experimentos el método de recolección no quirúrgico ha reemplazado completamente el método quirúrgico, y este último sólo se usa con algún fin específico.

METODO NO QUIRURGICO

Para este método se mantiene a la vaca con ayuno de 24 - horas con el fin de reducir el tamaño del rúmen, al momento de la operación se mantiene a la vaca en una manga de sujeción con la parte delantera más elevada, se aplica anestesia epidural baja, se vacía el recto para facilitar la manipulación del útero, se puede recurrir a una pequeña bomba de vacío por si el recto se llena de aire, después se limpia, se rasura y desinfecta toda la región perineal, se puede utilizar yodo o cualquier otro desinfectante.

TABLA 2,1, COMPOSICION DE LOS MEDIOS PARA RECOLECCION Y CONSERVACION DE EMBRIONES. 16

INGREDIENTES	DULBECCO FBS MODIFICADO (GWATKIN 1972)	MEDIO DE CULTIVO PARA TEJIDOS 199 GIBCO	MEDIO MENEZO B-2 (MENEZO 1976)	MEDIO ESENCIAL MINIMO GIBCO	MEZCLA DE NUTRIENTES F-10 HAM GIBCO	FLUIDO SINTETICO DEL OVIDUCTO (TREVIT, et al 1972)	MEDIO WHITTEN (GWATKIN 1972)
SALES INORGANICAS							
NaCl	8000	8000	5250	6800	7400	6300	5140
KCl	200	400	800	400	285	5300	356
CaCl ₂	100	140	-	200	33	190	-
MgCl ₂ 6H ₂ O	100	-	-	-	-	100	-
MgCl ₄ 7H ₂ O	-	200	200	200	153	-	294
NaHCO ₃	-	350	2500	2200	1200	2106	1900
Na ₂ HPO ₄	1150	48	61	-	154	-	-
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	-	-	-	140	-	-	-
KH ₂ PO ₄	200	60	60	-	83	160	162
CARBOHIDRATOS							
Glucosa	1000	1000	1200	1000	1100	270	1000
Piruvato Sodico	36	-	250	-	110	36	36
Lactato Sodico	-	-	-	-	-	370	2416
Ca Lactato ₂ 5H ₂ O	-	-	644	-	-	-	527
Ribosa	-	.5	-	-	-	-	-
Dexoxiribosa	-	.5	-	-	-	-	-
AMINOACIDOS	NADA	Contiene 21	Contiene 23	Contiene 13	Contiene 20	NADA	NADA
VITAMINAS	NADA	Contiene 16	Contiene 1	Contiene 8	Contiene 10	NADA	NADA
ACIDOS NUCLEICOS Y PRECURSORES	NADA	Contiene 8	NADA	NADA	Contiene 2	NADA	NADA
ELEMENTOS	NADA	Contiene 1	NADA	NADA	-	-	-
TRASA	-	-	-	-	Contiene 3	NADA	NADA
OTROS COMPONENTES							
Suero Albutina BOV.	Variable	Variable	10000	Variable	Variable	Variable	3000
Coolesterol	-	.2	125	-	-	-	-
Acetato Sodico	-	50	50	-	-	-	-
ACIDO LIPOICO	-	-	-	-	.2	-	-
TWEEN 80	-	20	50	-	-	-	-
GLUTATION	-	.05	-	-	-	-	-
TocoferolPO ₄ (Na)	-	.01	-	-	-	-	-

Por vía rectal se localiza el tracto reproductor, se -- palpan los ovarios para determinar el número de cuerpos lú-- teos presentes, y compararlo después con el número de óvulos recobrados, y para saber en que cuerno se encuentran más óvu los.

Son muchos los instrumentos que se han usado para la -- extracción de embriones, el más usado es el Cateter Foley -- que es una manguera de latex, con tres canales, uno de estos infla un globo que se encuentra casi al final del cateter, y los otros dos sirven para introducir y extraer el líquido -- por separado. La sonda Foley puede ser también de dos cana-- les, uno tiene el globo y el otro sirve para introducir y -- extraer el medio.

Como el cérvix al tiempo de la extracción (después del día 5) se encuentra cerrado firmemente se puede usar un dilata-- dor para abrir el canal cervical, una vez abierto se intro-- duce el cateter a través del cérvix con la ayuda de un estilete y se dirige a un cuerno, el globo se infla junto a la - bifurcación y sirve para tapar la salida del cuerno y para - evitar que la sonda se mueva de lugar. Cuando el globo esta inflado se puede iniciar el lavado de cada cuerno, si el glo-- bo se deja en el cérvix se pueden lavar ambos cuernos y el - cuerpo del útero a la vez.

El cateter se conecta a la botella de líquido y se deja que entre por gravedad, levantando la botella un metro arriba del animal. El cuerno uterino se distiende con el líquido hasta que se siente turgente entonces se interrumpe la entrada de líquido, se masajea el cuerno y se extrae el líquido - en un recipiente colector, se repite la operación hasta completar un litro de la solución y se procede igual con el -- otro cuerno. Con cada lavado el cuerno se va relajando más y más logrando gradualmente mayor distensión, lo cual permite

que se desprendan todos los óvulos que se encuentran en los pliegues de la pared uterina.

El medio extraído se debe conservar en una incubadora a 37°C, y se deja reposar durante 30 minutos, para que los óvulos vayan al fondo, después se vacían en pequeñas cajas de cristal para ser observados en el microscopio estereoscópico.

Como el útero es más susceptible a infecciones en el tiempo de la extracción de los embriones, al terminar la operación se debe inundar el útero con una solución a base de penicilina estreptomocina.

Normalmente los embriones son recolectados en los días 6 y 8 después de aparecido el estro pero algunos investigadores recomiendan la recolección en los días 10 y 11 del ciclo para disminuir los problemas de evaluación de los cigotos.

Las dos grandes desventajas del método no quirúrgico -- son que no todos los óvulos presentes en el útero al momento de la recolección son recobrados, y que la persona que palpa los ovarios tiene una ligera idea de los óvulos que se desprenden pero que es menos exacta que con el método quirúrgico, y si hay una anomalía en el tracto, como por ejemplo una obstrucción o adherencias periováricas no pueden ser visualizados como con el método quirúrgico en donde se puede revisar todo el tracto. Aún así el método no quirúrgico es preferible ya que no pone en peligro la vida del animal ni disminuye su fertilidad. (Tabla 2.2.)

A continuación se mencionan los 8 puntos básicos que deben tomarse en cuenta para la extracción no quirúrgica de embriones.

Puntos importantes que deben tomarse en consideración -
en el momento de la recolección de Embriones con el método -
No Quirúrgico.

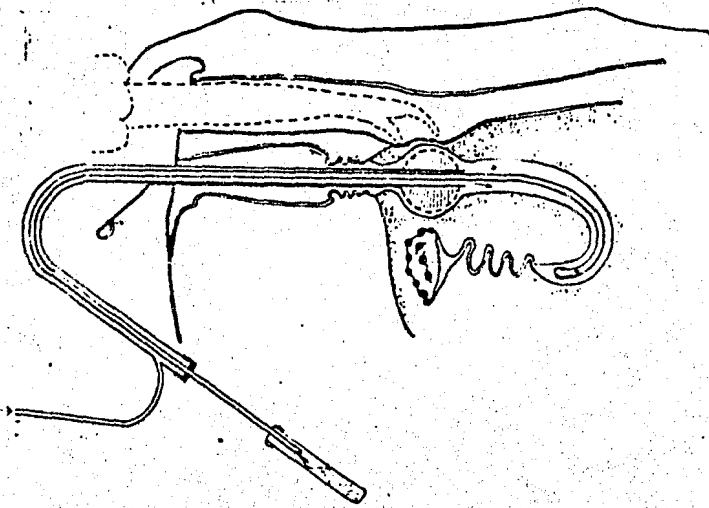
- 1.- Que se trata de una operación extremadamente delicada por lo cual es necesario tener considerable destreza, práctica y paciencia para dominar la técnica.
- 2.- Los principi^lantes deben usar siempre un dilata^dor cervical que ayuda a introducir el catéter a través del cérvix y es muy conveniente para su dilatación.
- 3.- Después de pasar el catéter a través del cérvix debe tenerse extremado cuidado y paciencia para que el catéter sea introducido en el lumen del cuerno uterino, apresurarse en ese momento podría causar daño al endometrio.
- 4.- El total de aire necesario para inflar el globo debe de juzgarse de acuerdo a la talla del útero, mucho aire puede romper el endometrio.
- 5.- El globo del catéter debe ser checado antes de su uso, una distensión desigual de éste puede causar problemas como pliegues que pueden romper el endometrio.
- 6.- El estilete debe ser fijado firmemente en el catéter mientras es introducido a través del cérvix y del cuerno uterino, de otra manera la punta del estilete puede salirse a través de uno de los orificios del catéter y lastimar el endometrio.
- 7.- Evitar que el masaje severo pueda causar fricción en el endometrio.
- 8.- La infusión de antibióticos en el útero después de completar la recolección no quirúrgica es extremadamente importante, la falta de estos puede causar una infección en el útero, lo cual traería fallas reproductivas.

Tabla 2.2. METODOS DE RECOLECCION VENTAJAS Y DESVENTAJAS.

	RECOLECCION DE EMBRIONES	
	QUIRURGICO	NO QUIRURGICO
Tipo de Anestesia.	General	Epidural Baja.
Sujeción.	Indispensable	Ayuda, pero no es indispensable.
Facilidad para recobrar los embriones en cualquier estado.	Excelente	Limitada .
Facilidad para precisar y evaluar el número de óvulos.	Excelente	Regular
Riesgo de agudas complicaciones en la donadora.	Definitivamente posible.	Virtualmente ninguna.
Riesgo de futuras complicaciones reproductivas de la donadora.	SI	Probablemente
Porcentaje de recolección Embrionaria.	Excelente	Buena
Facilidad para diagnosticar y evaluar alguna patología en el tracto reproductor.	Buena	Regular
Posibilidad de realizarse en la granja.	Ninguna	SI

Tomado de Veterinary Endocrinology and Reproduction.

FIGURA 2.2. TECNICA NO QUIRURGICA DE RECOLECCION DE OVULOS.



TOMADO DE: Sugie T., Seidel G.E., y Hafez E.S.E., 1980.

Después de leer el capítulo 2 responde este cuestionario y compara las respuestas con las de la página V; Si acertaste sigue adelante, si fallaste vuelve a leer el capítulo 2.

CUESTIONARIO No. 2

MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

- 1.- ¿Cuáles son los métodos de recolección?
- 2.- ¿De éstos cuáles son los no recomendables?
- 3.- ¿En qué tiempo del ciclo estral se recomienda hacer la recolección de los embriones por el método quirúrgico?
- 4.- ¿En qué área se hace la insición y de qué tamaño?
- 5.- Describe brevemente el método de recolección quirúrgico con tus propias palabras.
- 6.- ¿Qué medio se usa para la recolección?
- 7.- ¿Qué tipo de anestesia se usa para la recolección no quirúrgica?
- 8.- ¿En qué tiempo se hace la extracción no quirúrgica?
- 9.- ¿Qué características tienen las Sondas Foley de 3 y 2 canales?
- 10.- Describe brevemente la técnica de recolección no quirúrgica, con tus propias palabras.
- 11.- ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de cada método?

BIBLIOGRAFIA. (Métodos de Recolección)

- 1.- ELDBEN P., (1977). Extracción de óvulos vacunos sin emplear Cirugía. Agricultura de las Américas, Oct. 14.
- 2.- JILLELA D., (1982). Embryo Transfer Technology - and its application in developing countries. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO).
- 3.- PINEDA M.H., and Bowen R.A., (1980). Embryo -- Transfer in Veterinary Endocrinology and Re-- production. 3th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.

3.- EVALUACION DE LOS EMBRIONES

Para poder evaluar los embriones necesitamos conocer su morfología, aquí damos algunos datos importantes.

El diámetro de un embrión ha sido estimado alrededor de 150-190 μ incluyendo la zona pelúcida que mide 12-15 μ m. y este tamaño no cambia sino hasta la expansión del blastocisto. En el desarrollo temprano de un embrión se le refiere -- por el número de Blastómeros presentes, así un embrión de 2 Blastómeros, embrión de 8 Blastómeros, hasta el estado de 16 Blastómeros, donde el examen microscópico revela sólo una estimación del número de células presentes en el desarrollo -- posterior a las 16 células, por lo que se usa otra nomenclatura.

MORULA. Se asemeja a un racimo de células, cada blastómero es difícil de diferenciar de otro. La masa celular del embrión ocupa la mayoría -- del espacio vitelino.

MORULA COMPACTA. Los blastómeros se colapsan formando una masa compacta. La masa embrionaria -- ocupa de un 60 a un 70% del espacio vitelino.

BLASTOCISTO TEMPRANO. Es una masa de células que ha formado una cavidad llena de fluido (blastocelo) y el embrión ocupa de un 70 a un 80% del espacio vitelino; la diferencia del trofoblasto en el interior de la masa celular es posible en este estado de desarrollo.

BLASTOCISTO. Se encuentra una marcada diferenciación de la capa externa del trofoblasto y una opacidad más compacta es evidente en -- el interior de la masa celular. El blastocelo es altamente prominente, y el embrión

ocupa la mayor parte del espacio vitelino.

BLASTOCISTO EXPANDIDO. El diámetro del embrión se incrementa rápidamente (1.2X a 1.5X) con la reducción de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original, los embriones recobrados en este estado -- parecen estar colapsados, esto es caracterizado por la pérdida parcial o total del blastocelo, sin embargo la zona pelúcida -- rara vez recupera su espesor original.

BASTOCISTO LIBRE. Los embriones recobrados en este estado de desarrollo pueden estar iniciando el proceso de liberación o pueden estar completamente desprendidos de la zona pelúcida. El blastocisto puede ser esférico -- con su blastocelo bien definida, o bien -- colapsado. La identificación de los embriones en este estado puede ser difícil para un operador inexperto.

Conociendo la morfología del embrión podemos iniciar la evaluación, con la información de Linder y Wright (1983), -- los cuales hicieron un análisis de embriones de vacas hipervuladas de diferentes razas lecheras. Los embriones fueron recolectados en los días 5 y 9 postestro, el día cero se tomó como el día del estro. Todos los embriones fueron examinados individualmente para ver el estado de desarrollo de las células y la calidad de los mismos. Los embriones con un específico estado de desarrollo celular fueron designados a un código de desarrollo que correspondía a la edad estimada con respecto al número de días siguientes al estro en que fueron colectados. (fig. 3.1.)

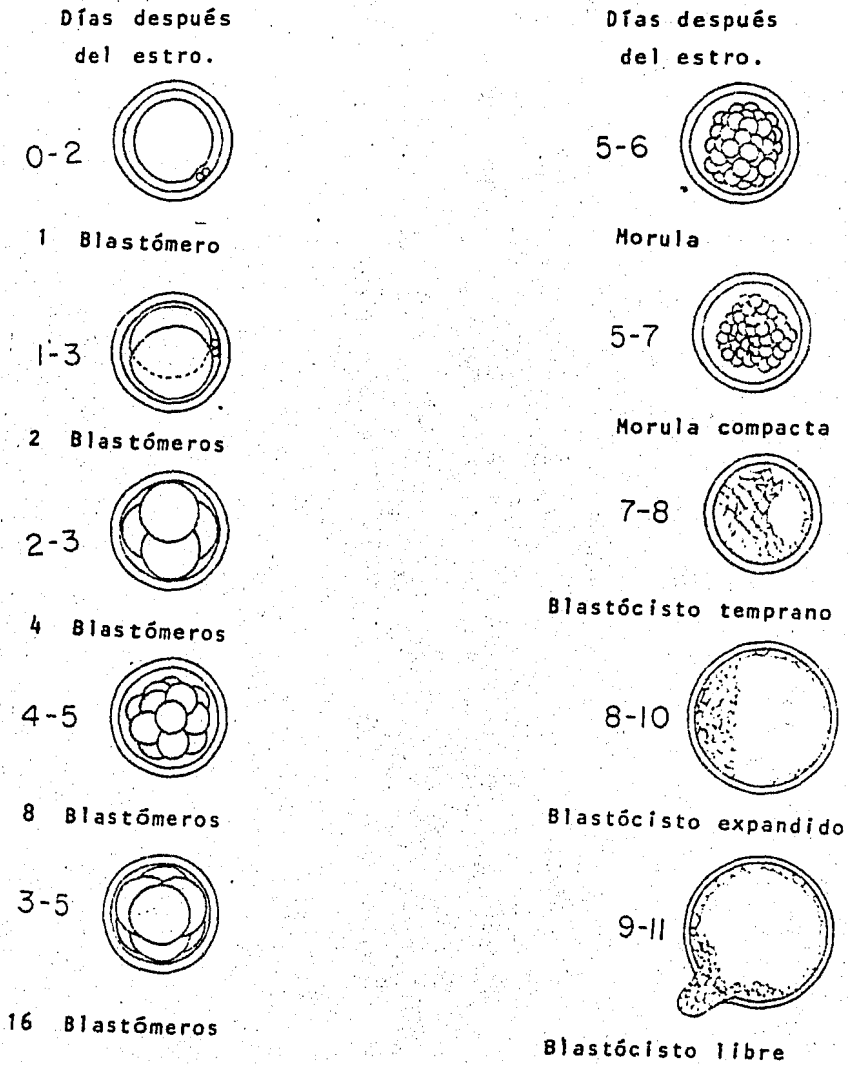


Figura 3.1. EMBRIONES MORFOLOGICAMENTE NORMALES RECOBRADOS EN VARIOS ESTADOS DE DESARROLLO.

ESTADO CELULAR	CODIGO DE DESARROLLO
MORULA	5 días
MORULA COMPACTA	6 días
BLASTOCISTO TEMPRANO	7 días
BLASTOCISTO EXPANDIDO	8 días
BLASTOCISTO LIBRE	9 días

La calidad de los embriones fue determinada con el siguiente criterio.

EXCELENTE. Un embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniformes.

BUENO. Imperfecciones triviales tales como pocos blastómeros, forma irregular y con pocas vesículas.

REGULAR. Problemas definidos pero no severos, presencia de blastómeros irregulares, vesiculación y pocas células degeneradas.

MALO. Problemas severos, numerosos blastómeros rugosos, células degeneradas, de tamaño irregular, un gran número de vesículas pero la masa celular posee una apariencia viable.

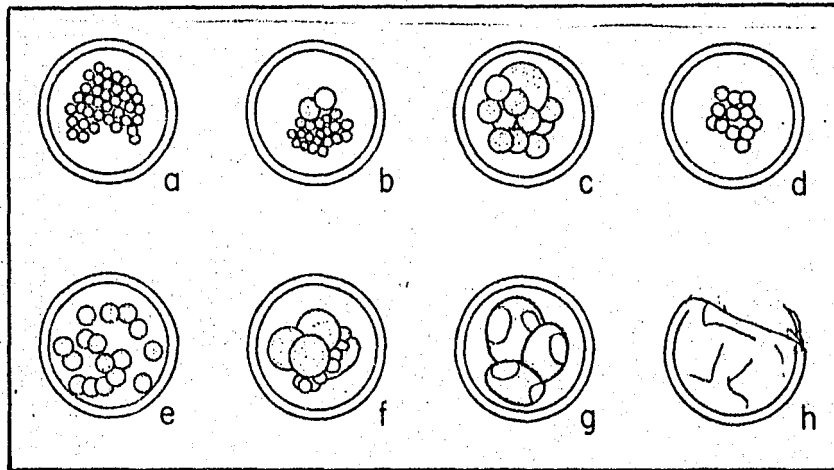
Los embriones morfológicamente anormales son aquéllos - en donde la morula es oval, o tiene los blastómeros excluidos, o cuando los blastómeros son irregulares, cuando la morula tiene basuras o desechos celulares, cuando hay pérdida o disgregación de los blastómeros, masas celulares, o cuando la zona pelúcida está rota, agrietada o vacía. En todos estos casos los embriones no deben ser usados para la transferencia de embriones de rutina. (Fig. 3.2. y 3.3.)

El estado de desarrollo parece tener poco efecto en el porcentaje de preñez lograda (tabla 3.1.), la calidad de los embriones parece tener mayor relación con los porcentajes de preñez logrados (tabla 3.2.), pero se nota que los embriones

pobres pueden producir preñez, así como no todos los excelentes y buenos la producen, por lo que se supone que existen otros factores involucrados.

El efecto de sincronización entre donadora y receptora y entre las receptoras y la edad aproximada del embrión está en la tabla 3.3. Se puede notar que \pm dos días de sincronización pueden ser tolerados sin una significativa reducción en el porcentaje de preñez, pero que la sincronización entre las receptoras y el estado de desarrollo embrionario es más estricto. Aproximadamente 90% de preñez se obtiene con \pm 1 día de sincronización entre receptora y donadora con respecto a la aparición del estro.

FIGURA 3.2. EMBRIONES MORFOLOGICAMENTE ANORMALES.



TOMADO DE: Sugie T., Seidel G.E., y Hafez E.S.E., 1980.

- a) MORULA COMPACTA CON LA ZONA PELUCIDA OVAL. b) MORULA CON BLASTOMEROS IRREGULARES. c) BLASTOMEROS IRREGULARES. d) MORULA CON ESCOMBROS. e) PERDIDA DE BLASTOMEROS. f) MASA DE CELULAS IRREGULARES. g) VACUOLAS EN EL CITOPLASMA h) ZONA PELUCIDA ROTA Y VACIA.

Tabla 3.1. Efecto del estado de desarrollo embrionario en el porcentaje de preñez.

ESTADO CELULAR	NUMERO DE TRANSFERENCIAS	NUMERO DE PREÑADAS (%)
16 células	5	2 (40)
Morula	15	5 (33)
Morula Compacta	119	40 (34)
Blastócisto Temprano	124	43 (35)
Blastócisto	86	34 (40)
Blastócisto Expandido	131	66 (50)
Blastócisto Libre	24	9 (38)

(Tomado de Linder y Wright 1983)

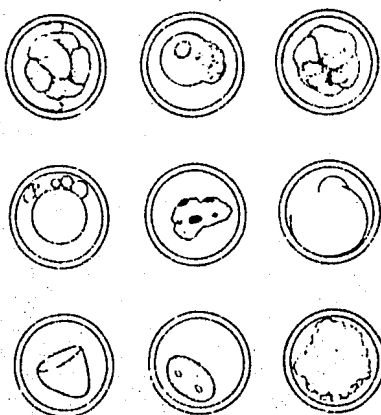


Figura 3.3. OVULOS EN DEGENERACION QUE NO DEBEN SER USADOS PARA LA TRANSFERENCIA RUTINARIA.

Tabla 3.2. Efecto de la calidad del Embrión en relación con el porcentaje de preñez.

CATEGORIA	NUMERO DE TRANSFERENCIAS	NUMERO DE PREÑADAS (%)
Excelente	220	98 (45)
Bueno	170	76 (45)
Regular	85	21 (45)
Malo	29	4 (14)

(Tomado de Linder y Wright 1983)

Tabla 3.3.- Efecto de la sincronización del estro entre donadora y receptora y receptora y desarrollo embrionario en el porcentaje de preñez.

SINCRONIZACION (dfas)	SINCRONIZACION ENTRE RECEPTORA-DONADORA			SINCRONIZACION ENTRE RECEPTORA-EMBRION		
	N	No. Preñadas	(%)	N	No. Preñadas	(%)
+ 2	16	6	(38)	53	12	(22)
+ 1	52	26	(50)	92	47	(51)
0	100	42	(42)	146	77	(53)
- 1	118	59	(50)	61	31	(51)
- 2	104	41	(39)	38	7	(19)

(Tomado de Linder y Wright 1983). Sólo embriones de --- excelente y buena calidad fueron incluidos en estos datos.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- SUGIE T., Seidel G.E., and Hafez E.S.E., (1980). Embryo Transfer in Reproduction In Farm Animals. 4th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.
- 2.- LINDER M.G.; WRIGHT W.R. Jr., (1983). Bovine Embryo Morphology and Evaluation. IXth. Annual Meeting of International. Embryo Transfer Society. Colorado State University.
- 3.- PINEDA M.H., and Bowen R.A., (1980). Embryo - Transfer In Veterinary Endocrinology and Reproduction. 3th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.
- 4.- WRIGHT W.R. Jr., (1983). Comparative Morphology of Embryos from Farm Animals. IXth. Annual Meeting of International. Embryo Transfer Society. Colorado State University.

Después de leer el capítulo 3 responde este cuestionario y compara las respuestas con las de la página VIII; Si -- acertaste sigue adelante, si fallaste vuelve a leer el capítulo 3.

CUESTIONARIO No. 3

EVALUACION DE LOS EMBRIONES

- 1.- ¿Qué diámetro tiene el embrión?
- 2.- ¿De esa medida cuánto corresponde a la zona pelúcida?
- 3.- ¿Cuándo empieza a crecer?
- 4.- ¿Qué nomenclatura se usa para embriones de más de 16 células?
- 5.- ¿Cuántos días se les calcula a cada una de las faces embrionarias?
- 6.- ¿Cómo se clasifican los embriones normales y qué características tiene cada uno de ellos de acuerdo a su calidad?

4.- TIEMPO Y TECNICAS DE TRANSFERENCIA

Para escoger el tiempo en que se debe realizar la transferencia se toman en cuenta dos factores.

- a) Edad y desarrollo embrionario.
- b) Grado de sincronización entre la donadora y la receptora.

Si los embriones son de menos de ocho células (2-4 días después de la ovulación) deben ser transferidos en el oviducto, y que en este tiempo son más susceptibles a daños en el útero debido a que las secreciones uterinas pueden ser tóxicas para ellos; los porcentajes de preñez que se logran son menores que cuando se realiza la transferencia en días posteriores.

Cuando un embrión tiene más de ocho células, (5 días -- después de la ovulación) deben ser transferidos en los cuernos uterinos.

Muchos autores recomiendan la transferencia después del día 5, ya que el cuerpo lúteo de la receptora no produce progesterona sino hasta el día 4, por lo que en el día 5 el endometrio ya se encuentra bajo la influencia de la progesterona y el embrión tendrá un ambiente más hospitalario.

La mayor parte de las transferencias comerciales se realizan después del día 6 porque se obtienen mayores porcentajes de preñez.

El embrión debe colocarse en el cuerno uterino ipsilateral al ovario que presente el cuerpo lúteo, en la tabla 4.1, se resumen los datos de algunos autores a este respecto, se debe notar que los porcentajes de preñez son mayores cuando la transferencia se hace en el cuerno en el que el ovario -- presenta el cuerpo lúteo.

Tabla 4.1. Efectos del sitio de transferencia y el porcentaje de preñez. (Tomado del Seidel, G.E., 1981)

AUTORES	TRANSFERENCIA IPSILATERAL		TRANSFERENCIA CONTRALATERAL	
	No.	%	No.	%
New Comb & Rowson (1976)	13	46	13	0
Sreenan (1976)	31	61	22	18
Trevitetal (1977)	28	50	28	36
New Comb et al (1978)	20	85	20	30
Del campo et al (1979)	15	67	15	13
Holzer et al (1979)	576	39	55	18

Las técnicas de transferencia son dos, la Quirúrgica y la No Quirúrgica.

TECNICA DE TRANSFERENCIA QUIRURGICA

Los intentos de la transferencia de embriones en los animales tuvieron poco éxito hasta los trabajos de Hunter et al en 1955, quien lo realizó en la oveja. El procedimiento que él usó fué adoptado por numerosos investigadores.

Con los trabajos de Rowson et al (1969, 1971, 1972 tomado de David J.S.E. 1977), se marcó un importante avance dentro de la transferencia de embriones en Bovinos, no sólo por que se logra un buen porcentaje de preñez sino porque ese porcentaje puede ser alrededor de los porcentajes que se lo gran por métodos de reproducción convencionales.

Esta técnica se desarrolló por medio de la incisión en la línea media del abdomen, bajo anestesia intubada con halotano lo cual causa una relajación de la musculatura uterina y representa un poco de problema para la manipulación del tracto y la expulsión de los embriones después de la transferencia, por lo que los resultados no son siempre los deseados.

En 1973, Baker menciona la posibilidad de introducir los embriones por incisión en el flanco bajo anestesia regional, lo cual representa un avance porque de esta manera las vacas que se encuentran en producción láctea ya no tendrán problemas con dicha producción como cuando la incisión se hace en la línea media.

En la transferencia quirúrgica el embrión es introducido en el útero por medio de laparatomía; se utilizan dos técnicas laparatomía, en los bovinos una es por medio de la incisión en la línea media, o bien con la incisión en la fossa sublumbar.

Para hacer la transferencia utilizando la técnica de incisión en la línea media, se prepara a la receptora para cirugía de la misma manera que se prepara a la donadora, o sea, con ayuno de 24 a 36 horas, se induce anestesia general, el área anterior a la ubre se lava, rasura y desinfecta, y se hace una incisión de 15 cm., de largo dependiendo de la talla del animal, sobre la línea alba. Se expone el útero a través de la incisión, se debe identificar el ovario que posee el cuerpo lúteo, y el embrión es transferido en el extremo del cuerno uterino ipsilateral al ovario que presenta el cuerpo lúteo, con una pipeta Pasteur; se debe tener cuidado de que el embrión sea depositado dentro del lumen del cuerno uterino y no en el endometrio. Se pueden lograr altos porcentajes de preñez (70%) por este método, pero su

factor limitante es el costo que involucra, por lo que este método ha sido desplazado por los que son más prácticos y -- baratos usando este sólo para algún fin específico.

En la técnica de transferencia por incisión en el flanco, se debe palpar a la receptora para localizar el lado en que se encuentra el cuerpo lúteo, y realizar la transferencia en ese lado. Se aplica anestesia regional, y se hace la asepsia de la región, se hace la incisión en la fosa sublumbar del lado que se encuentra el cuerpo lúteo y se exterioriza el cuerno uterino. El embrión debe ser depositado en el extremo del cuerno uterino cerca del oviducto, con una pipeta Pasteur o una micropipeta, teniendo cuidado de que se deposite en el lumen y no en el endometrio. El problema que se puede encontrar es que el útero no este lo suficientemente cerca del sitio de la incisión, lo cual representa mayor manipulación que puede dar como resultado la expulsión de los embriones transferidos, pero aún con este inconveniente se han reportado porcentajes de preñez del 40 al 70% en diferentes trabajos.

TECNICA NO QUIRURGICA

Un punto de importancia en la tecnología de la transferencia de embriones en bovinos para la explotación del ganado es el desarrollar una técnica sencilla, No Quirúrgica, y que se pueda desarrollar en la granja, similar a la técnica de inseminación artificial. Por esta causa muchos investigadores concentraron sus esfuerzos en lograr un método de transferencia No Quirúrgica a través del cervix, pero en un principio no tuvieron éxito; se pensó primero que se debía a que el útero en el tiempo de la transferencia era susceptible a infecciones y que era eso lo que no permitía la concepción, por lo que se les adicionó antibióticos en el medio --

para contrarrestar la infección y que a la vez no interfirieran con la preñez normal. Poco después se encontró que las contracciones uterinas resultando de la liberación de oxitocina por la manipulación del cervix era lo que impedía la preñez. Los esfuerzos continuaron sin que se logaran porcentajes de preñez que tuvieran interés comercial. En 1963, Hafez y Sugie desarrollaron un instrumento para pasar a través del cervix usando dióxido de carbono para distender el útero después de la transferencia pero este método no incrementó en mucho los porcentajes de preñez. Después se utilizó una pistola de Inseminación Artificial en 1975 por Sreenon et al y en 1978 utilizaron un tubo de poliuretano y una pipeta de Inseminación artificial.

El procedimiento con la pistola Cassou para inseminación artificial es el siguiente:

El embrión es aspirado por una pipeta de .25 ml. o de .5 ml. de Inseminación artificial en la cual debe quedar cerrado entre dos burbujas de aire, y la pistola es cargada como en la técnica para Inseminación artificial. Se emplea anestesia epidural y se localiza el cuerno ipsilateral por palpación de los ovarios, la región perineal y la vulva son lavados y desinfectados. La pistola de Inseminación Artificial es introducida a través del cervix, hasta llegar a la mitad del cuerno ipsilateral al que presenta el cuerpo lúteo y es donde el embrión es depositado suavemente. Los porcentajes de preñez por este método pueden variar del 30 al 60%.

La transferencia transcervical usando un tubo de poliuretano y una pipeta de Inseminación Artificial se realiza -- como sigue:

Se coloca al embrión en el tubo de poliuretano entre dos burbujas de aire, el tubo se introduce en una pipeta de

Inseminación Artificial. La receptora es preparada como en el método anterior y después la pipeta de Inseminación Artificial es introducida por el cervix hasta la parte media del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, en este punto el tubo de poliuretano se empuja hasta alcanzar el extremo del cuerno donde se deposita el embrión, la pipeta y el tubo se retiran juntos del útero procurando no causar daño al endometrio. Con este método se han reportado porcentajes de concepción del 54%.

Muchos factores influyen la supervivencia embrionaria después de la transferencia No Quirúrgica estos factores son:

- Edad del Embrión.
- Sitio donde son depositados.
- Destreza del operador.
- Grado de sincronización.

Algunos puntos importantes que se deben considerar en la transferencia de embriones son:

- 1.- Se debe palpar a la receptora uno o dos días antes de la transferencia para conocer la formación y la talla del cuerpo lúteo, así como el lado en que esta situado, de esta manera se evita la excesiva manipulación del útero y los ovarios al tiempo de la transferencia.
- 2.- La limpieza y la esterilidad de la operación son extremadamente importantes, ya que el útero esta en la fase lútea y es altamente susceptible a infecciones.
- 3.- La destreza para la manipulación y la paciencia son muy importantes para obtener altos porcentajes de preñez. La paciencia debe ser aplicada cuando se introduce la pipeta de Inseminación Artificial a través del cervix y

del cuerno uterino; como los instrumentos son rígidos es fácil que se provoque la ruptura de la pared uterina.

- 4.- La anestesia epidural ayuda a ejecutar la operación con facilidad y menor daño al animal.
- 5.- La dilatación del cervix con un dilatador cervical esta contraindicada, por aumentar las posibilidades de infección.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- DAVID J.S.E.; JONES W.A.; NEWCOMB R.; SMITH G.F.; WISHART D.F.; (1977). Embryo transfer with a particular reference to cattle. British Veterinary Association.
- 2.- JILLELLA D., (1982). Embryo Transfer Tecnology and its application in developing countries. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO).
- 3.- PINEDA M.H., and Bowen R.A., (1980). Embryo - Transfer in Veterinary Endocrinology and Reproduction. 3th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.
- 4.- SEIDEL G.E., (1981). Embryo Transfer in the cow. Mimeograph. 46 pp. Colorado State University.
- 5.- SUGIE T., Seidel G.E., and Hafez E.S.E., (1980). Embryo Transfer in Reproduction in Farm Animals. 4th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.

Después de leer el capítulo 4 responde este cuestionario y compara las respuestas con las de la página IX; Si acertaste sigue adelante, si fallaste vuelve a leer el capítulo 4.

CUESTIONARIO No. 4

TIEMPO Y TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA.

- 1.- ¿Qué factores se toman en cuenta para realizar la transferencia?
- 2.- ¿En qué lugar se deposita el embrión?
- 3.- ¿Por qué razón es más recomendable realizar la transferencia después del día 5?
- 4.- ¿Qué entiendes por ipsilateral?
- 5.- ¿Cuáles son las técnicas de transferencia?
- 6.- Describe brevemente cada una de las técnicas.

5.- CONSERVACION DE EMBRIONES

La conservación de los embriones es otro de los puntos importantes dentro de la tecnología de la transferencia embrionaria. La conservación de los embriones comprende desde el momento en que son extraídos hasta cuando son depositados en el aparato reproductor de la receptora, abarca puntos como:

Medio de Conservación y Cultivo.

Conservación a temperatura ambiente.

Almacenaje por cortos períodos de tiempo.

Almacenaje por largos períodos de tiempo (congelación).

MEDIO DE CONSERVACION Y CULTIVO

La composición de los medios que generalmente se usan para la conservación y el cultivo de embriones es presentada en la tabla 2.1. Al medio se le añaden 50 mg. de sulfato de Estreptomicina y 100,000 UI de penicilina G potástica por litro, pero también se le pueden añadir otras concentraciones u otros antibióticos y fungicidas. El medio debe hacerse pasar por un filtro primero de 0.45 μ de diámetro y después por otro filtro milipore de 0.22 μ de diámetro, para quitar las bacterias que pudieran existir.

El medio debe contener Suero Fetal Bovino (SFB) en concentraciones de 5 a 20%, o bien Suero Albumina Bovino (SAB) en concentraciones de 0.1 a 3%. Todos los medios a excepción del medio Salino Fosforado y Bufferado (SFB) requieren una atmósfera de 5% de CO₂ para mantener un pH adecuado, esto también se logra con una mezcla de CO₂ en aire o bien 5% de CO₂ y 90% en N₂, un incubador cerrado y con tubos marcadores puede ser usado.

Cuando el medio debe ser mantenido en el aire ambiental, (sin CO_2) por largos periodos de tiempo se le puede añadir 0.25 mm. de HEPES bufer (N-2 hidroxietil piperazina -N-2-ácido etanosulfónico) y el NaCl se disminuye para mantener una adecuada osmolalidad.

Rojo fenol 1-20 mg./l es algunas veces añadido como indicador de pH. El pH puede tener un rango entre 7 y 8 pero los mejores resultados se obtienen entre 7.2 y 7.6. La osmolalidad puede ser ajustada entre 230-320 mOsm/Kg, por medio de la variación de NaCl. La osmolalidad entre 270-300 mOsm/Kg. es más comúnmente usada para embriones.

El agua es el principal ingrediente y su pureza es muy importante. La doble destilación o la destilación de agua defonizada es normalmente adecuada.

Para mantener a los embriones entre la extracción y la transferencia, cuando es por un corto periodo de tiempo se puede usar un medio simple como el descrito en la tabla 6.1., al parecer es adecuado.

COMPONENTE	CONCENTRACION	mM
NaCl	8.00	139.9
CaCl	0.10	0.9
MgCl 6 H ₂ O	0.10	0.5
KCl	0.20	2.7
KH PO	0.20	1.5
NaHPO 7H ₂ O	2.16	8.1

Tabla 6.1. Para extracción y almacenaje de embriones Medio salino fosfotado y buferado, comúnmente se le añade Suero Fetal Bovino. (Tomado de PINEDA M.H., Veterinary Endocrinology and Reproduction 1980).

CONSERVACION ENTRE 0° y 37°C.

Para la manipulación entre la extracción y la transferencia, los embriones son generalmente mantenidos en el medio de cultivo a 37°C. La mayoría de los estudios muestran que el desarrollo embrionario en estas condiciones es generalmente 2/3 partes más lento que lo normal "in vivo" pero los embriones se pueden desarrollar por 2 ó 3 días, algunas veces más, aunque los porcentajes de preñez son normalmente reducidos si se transfieren después de 24 hrs. "in vitro". En algunos experimentos donde se han cultivado embriones de 1-2 células hasta 4 células y de morula a blastula han sido satisfactorios, en otros donde se han cultivado desde estados tempranos de desarrollo hasta el estado de blastula han sido desalentadores.

Los embriones han sido mantenidos con éxito por varias horas hasta días a temperatura ambiente entre 15° y 25° C, también pueden enfriarse entre 0° y 10° con poca reducción de su viabilidad. Se pueden mantener también por algunos días en el oviducto ligado de un conejo, para al cabo de este tiempo ser recobrados y retransferidos a la receptora de su misma especie, esta técnica se usa para el transporte de embriones a una gran distancia, o bien para propósitos experimentales.

Para el almacenaje de embriones por largos períodos de tiempo y para facilitar su transporte, los embriones en etapa de morula o blastocisto, pueden ser congelados en nitrógeno líquido. La mayor desventaja de los embriones congelados es que los porcentajes de preñez logrados son por ahora sólo la mitad de los obtenidos con embriones no congelados, pero la tecnología de congelación de embriones está avanzando rápidamente.

CONGELACION DE EMBRIONES

El primer reporte del nacimiento de un mamífero (ratón) que había sido congelado como embrión fué en 1972, después de esto y en un corto período de tiempo la tecnología de --- congelación de embriones ha sido ampliamente aplicada en bovinos, ovinos y caprinos. Los embriones porcinos son extremadamente sensibles al enfriamiento por lo que los trabajos para esta especie han sido poco satisfactorios.

La congelación de embriones ofrece muchas aplicaciones prácticas. El tiempo que los embriones pueden ser mantenidos "in vitro" limita la distancia en la que los embriones pueden ser transportados desde donde se encuentra la donadora al lugar donde serán transferidos a la receptora, este problema se soluciona por la preservación de embriones a bajas temperaturas.

El establecimiento de bancos de embriones congelados, que provienen de donadoras con alta calidad genética es muy útil para implementar los programas de mejoramiento genético.

La sincronización entre donadora y receptora es también un problema importante, por medio de la congelación de embriones se soluciona, ya que se contará con embriones disponibles para cuando la receptora está en el mejor momento de aceptarlos, o para cuando haya suficientes receptoras.

Con el transporte internacional de embriones congelados se disminuyen los costos cuando se tienen que importar animales de razas exóticas, ya que trasportando embriones es más fácil y rápido, y se evitan los problemas de transmisión de enfermedades así como la no adaptación de los animales importados.

Desde 1977 (Bilton R.J. et al) se vienen reportando na-

cimientos de bovinos cuyos embriones fueron congelados por varios meses.

La excesiva búsqueda de los investigadores ha llevado a establecer un estandar en la técnica de congelación de embriones. El congelamiento de éstos es ahora una rutina en la mayoría de los centros de transferencia embrionaria.

Los embriones seleccionados para congelación son mantenidos en solución Fosforada y Buforada (SFB) modificada con 20% de Suero Fetal Bovino a temperatura ambiente (15°C). Se prepara SFB en concentraciones de 0.5 M, 1.0 M y 1.5 M de dimetilsulfoxido (DMSO), como agente protector para congelación, los embriones son introducidos en estas concentraciones en tres etapas; 0.5 M por 10 minutos, 1.0 M por 10 minutos, 1.5 M por 20-30 minutos.

Después de 2 a 5 embriones son colocados en una ampula de vidrio con .25 ml. de 1.5 M DMSO-SFB, por un período de equilibrio entre 20 y 30 minutos. Después las ampulas son puestas en un congelador programable. Son enfriados de la temperatura ambiente a -7°C a una velocidad de -1°C/min.

Quando está a -6°C ó -7°C se aplica en las paredes del recipiente, una aguja que haya sido enfriada previamente en nitrógeno líquido, para inducir la formación de cristales de hielo. Después de esto se continúa la congelación en un promedio de -0.3°C/min. hasta los -30°C de esta temperatura y hasta -33°C los embriones son enfriados a una velocidad de -0.1°C/min., cuando alcanzan los -33°C son sumergidos en Nitrógeno líquido (-196°C) y pueden así ser almacenados por largos períodos de tiempo.

Los embriones son descongelados mediante la colocación de las ampulas en agua a 25°C, e inmediatamente son cambiados en medio fresco de 1.5 M DMSO-SFB el DMSO es removido en 6 eta--

pas; 1.5 M se mantiene por 5 min., 1.25 M, 1.0 M, 0.75 M, - 0.50 M, 0.25 M, por diez minutos en cada uno, y finalmente a SFB con 20% de suero fetal bovino. Los embriones descongelados son cultivados en el medio a 37°C por lo menos durante - 2-3 hrs., para evaluar la morfología y entonces pueden ser - transferidos a las receptoras, el criterio de evaluación es el mismo que se usa para embriones no congelados, los morfológicamente normales pero que no muestran desarrollo pueden ser cultivados durante 12 ó 36 hrs., para ver si se desarrollan ya que la velocidad de desarrollo después del deshielo puede estar disminuida (Renard J.P., 1981).

Los porcentajes de preñez que se obtienen varían de 25 a 40% (Renard J.P., 1981) reporta un 70% de preñez por métodos de congelación similares, pero hay que tomar en cuenta - no sólo los porcentajes de preñez sino también el porcentaje de sobrevivencia embrionaria, ya que algunos embriones no resisten el proceso. Otros investigadores (Willadsen S. et al 1976) muestran que el enfriamiento de embriones jóvenes (3 - días) provoca daños irreversibles no así en embriones más -- viejos (Morula o Blastula).

La tecnología de Congelación de Embriones se sigue desarrollando para reducir los problemas que existen y diseñar - una técnica simple, similar a la de Congelación de Semen.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- BILTON R.J.; MOORE N.W., (1977). Successful - Transport of Frozen Cattle Embryos, from New Zealand to Australia. Journal of Reproduction and Fertility (50.2).
- 2.- JILLELLA D., (1982). Embryo Transfer Technology and 1st Application in Developing Countries. - Food and Agricultural Organization of United - Nations (FAO).
- 3.- PINEDA M.H., and Bower R.A., (1980). Embryo - Transfer in Veterinary Endocrinology and Re- production. 3th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.
- 4.- RENARD J.P.; OZIL J.P.; HEYMAN Y. Cervical -- Transfer of Deep Frozen Cattle Embryos Therio- genology 1980, Vol. 15 No. 3 (311-320).
- 5.- SUGIE T., Seidel G.E., and Hafez E.S.E., (1980). Embryo Transfer in Reproduction in Farm Ani- mals. 4th. Ed. LEA and Febiger. U.S.A.
- 6.- WILLADSEN S.; TROUSON A.O.; POLGE C.; ROWSON - LEA; NEWCOMB R., (1976). Low Temperature Pre- servation of Cow Eggs. Scientific and Technical Information. (117-124).

Después de leer el capítulo 5 responde este cuestionario y compara las respuestas con las de la página XIII; Si acertaste sigue adelante, si fallaste vuelve a leer el capítulo 5.

CUESTIONARIO No. 5

CONSERVACION DE EMBRIONES

- 1.- ¿Cómo puedes conservar embriones?
- 2.- Cuando los conservas y cultivas por pocos -- períodos de tiempo hay medios establecidos -- que puedes utilizar: ¿Qué características especiales deben de cumplir?
- 3.- ¿El desarrollo de los embriones "in vivo" es igual al de los embriones "in vitro"?
- 4.- ¿Cuánto tiempo puedes mantener a un embrión entre 0° y 37°C?
- 5.- ¿Qué otro método puedes usar para mantenerlos durante 2-3 días con poca reducción de su viabilidad?
- 6.- ¿Qué solución se usa para congelar embriones y qué agente protector?
- 7.- ¿Qué concentración se usa del protector y como se le añade?
- 8.- Resume el método de Congelación.
- 9.- ¿Cómo se descongelan los embriones?
- 10.- ¿Cómo se elimina el DMSO?
- 11.- ¿Cuáles son los porcentajes de preñez obtenidos?
- 12.- ¿Cuándo se reportó el nacimiento del primer mamífero que había sido congelado como embrión?

6.- IMPORTANCIA ECONOMICA

Los principales problemas en México y en el mundo son la sobrepoblación y la desnutrición. La población crece a ritmo acelerado y la producción de alimentos no alcanza este ritmo de crecimiento. Para combatir la desnutrición es necesario disminuir el incremento de la población así como aumentar la producción de alimentos, por lo que constantemente se buscan nuevos métodos para mejorar la producción de los mismos no sólo en cantidad sino también en calidad.

En el inicio de la colonización de nuevas tierras para la agricultura la superficie de terreno cultivable fue en aumento a medida que creció la población humana, sin embargo en países densamente poblados se sufre ahora de problemas de desnutrición, ya que queda poca tierra que pueda explotarse para la alimentación humana. Las exigencias cada vez mayores de espacio para la vivienda, carreteras, industrias y aeropuertos, reducen cada día más la superficie de tierra disponible para fines agrícolas y ganaderos. Si el actual ritmo de crecimiento de población prevalece para el año 2000, es evidente que el hombre pronto tropezará con dificultades realmente graves para cubrir sus necesidades de alimento. Aún cuando las masas de población continuaran concentrándose en las ciudades, dejando así zonas rurales consideradas aptas para la producción de alimentos, habría poco espacio para la producción de piensos, para la explotación de ganado y el hombre se vería forzado a subsistir principalmente con alimentos de origen vegetal. Además el problema de producir alimentos suficientes y de calidad para cubrir las necesidades de una población que crece constantemente, el hombre se tendría que enfrentar también con los efectos de la sobrepoblación sobre el desarrollo económico, así la capacidad económica media de una persona para adquirir los alimentos de

origen animal quizá quedará por detrás de sus necesidades.

Una solución sería el controlar la población de manera más eficaz, para que haya una densidad de población equilibrada y razonable, que conceda suficiente espacio para que viva el hombre, y sitio para la explotación de ganado bastante para asegurar que cada persona reciba un buen aporte de proteína animal.

Así como medidas para controlar el aumento de población, deben adoptarse medidas que sean más eficientes para la producción de alimentos. Estas medidas de eficiencia no consisten sólo en aumentar por ejemplo el número de animales existentes, sino obtener más bien una mayor productividad, mejorando los métodos de explotación y reproducción de los animales, por lo que se debe aspirar a mejorar los métodos de trabajo para sacar al mercado los productos de demanda. El logro de una producción más eficiente y remunerativa sólo será un hecho por la selección intensiva de las razas de animales a explotar y poniendo en práctica los sistemas más modernos de alimentación, genética y reproducción animal.

La importancia de la mala nutrición en la salud y la vida reproductiva de la población son muy grandes. La mujer embarazada y los niños son susceptibles a deficiencias de proteínas. Durante el embarazo el feto obtiene de su madre todos los nutrientes, los niños nacidos de madres mal nutridas son susceptibles a enfermedades como por ejemplo anemia y raquitismo. La deficiencia de proteínas en los niños inhibe la formación de anticuerpos, lo cual disminuye la resistencia a las enfermedades. Durante los primeros años de vida, el crecimiento es caracterizado por la multiplicación de células, este es un proceso que requiere proteínas por la formación del DNA de las nuevas células. Durante los tres primeros años de vida el cuerpo y el cerebro crecen del 20 -

al 80% de la talla adulta respectivamente, por lo que una -- deficiencia de proteína durante los primeros años de vida -- impedirá el crecimiento normal y traerá consecuencias como -- inmadurez física y el deterioro del cerebro.

La leche, la carne y el huevo, son alimentos esenciales que reúnen muchos de los nutrientes que se requieren para -- una alimentación balanceada, y son la fuente de proteína ani -- mal.

La leche que se consume en México es generalmente de va -- ca, ya que la leche de cabra, por costumbre se utiliza para la producción de dulces y en menor escala de quesos. La producción láctea en México es insuficiente para la población y muchas veces se tiene que importar leche en polvo para cu -- brir las necesidades nacionales y aún así no todos los habi -- tantes de México y, lo que es más importante, no todos los -- niños consumen leche, por lo que se hace necesario incrementar al máximo la producción y esto se logra mejorando las -- formas de explotación y buscando incrementar la eficiencia -- reproductiva y el mejoramiento genético.

Estos puntos también son importantes en la producción -- de carne.

Los rumiantes por sus hábitos alimenticios y requeri -- mientos nutricionales no compiten con el hombre para su ali -- mentación y en cambio nos dan proteínas de excelente cali -- dad, por lo cual es a estas especies a las que debemos enfo -- car nuestra atención, y hacer un mejoramiento genético intro -- duciendo razas y animales con mayor eficiencia en producción de leche y carne y haciendo que éstas se multipliquen rápida -- mente. Para este fin la inseminación artificial ha contribui -- do grandemente; ahora utilizando la transferencia de embri -- ones es posible aumentar la explotación de las hembras de alto valor genético, incrementando la producción de proteína --

animal más rápidamente que con los métodos de cruzamiento -- convencionales.

Las aplicaciones de la transferencia embrionaria son -- amplias, ésta ha exitado la imaginación de investigadores -- y ganaderos y del público en general por sus múltiples aplicaciones en la producción animal y en la medicina humana.

Al principio de este trabajo se habló de las aplicaciones que tiene actualmente y las que se podrán dar en el futuro, y no está de más enumerarlas:

- 1.- Incrementa la progenie de hembras genéticamente superiores.
- 2.- Multiplica los animales de razas extranjeras que puedan ser más productivas.
- 3.- Reduce el intervalo entre generaciones.
- 4.- Aumenta la posibilidad de producir partos gemelares.
- 5.- Puede hacerse el sexado de los embriones y así elegir el sexo de los productos, según la conveniencia del ganadero.
- 6.- Se pueden almacenar embriones congelados por largos períodos de tiempo.
- 7.- Facilita el transporte internacional.
- 8.- Se pueden producir gemelos idénticos.
- 9.- Se podrán producir clones de los animales más productivos.

Con la introducción de la tecnología de la transferencia embrionaria se puede entonces aumentar la producción de proteína animal.

Con las técnicas de recolección y transferencia No Quirúrgica, que resultan más económicas se puede aumentar la -- progenie de las vacas más productivas que existan en el país.

Con el perfeccionamiento de la técnica de congelación de embriones es posible introducir razas extranjeras más productivas y eso resulta más barato que la importación de animales adultos.

Tomando en cuenta las valiosas aplicaciones de la tecnología de la transferencia de embriones en el mundo de la producción animal, se hacen las siguientes recomendaciones para establecer esta técnica en el país.

- 1.- Fomentar el estudio y la investigación de la técnica para mejorarla y hacerla cada vez más práctica y menos costosa.
- 2.- Hacer un programa de difusión nacional para dar a conocer la técnica, y que los veterinarios, técnicos y ganaderos conozcan sus ventajas.
- 3.- Organizar cursos nacionales de adiestramiento para preparar a los veterinarios y técnicos.
- 4.- Establecer centros que proporcionen el servicio a los ganaderos que lo solicitan.
- 5.- Establecer bancos de embriones congelados donde se almacenen embriones de vacas seleccionadas como buenas productoras, para que se distribuya entre los ganaderos.
- 6.- Establecer un hato de donadoras de excelente calidad. De este hato se pueden distribuir a los bancos de embriones.
- 7.- Establecer un centro de enseñanza e investigación continua en transferencia embrionaria e inseminación artificial.
- 8.- Obtener crías machos para ser probados en los centros de Inseminación Artificial.

Es imperiosa la necesidad de incrementar la producción de leche y carne, y la transferencia embrionaria es un método bueno para este fin.

En México existen pocos centros que la realizan, la mayoría son comerciales y buscan un fin lucrativo, por lo que se debe establecer un programa nacional con centros controlados que practiquen con los menores precios posibles.

Hay que fomentar la investigación sobre el tema para -- que en un futuro cercano sea tan práctica y útil como la Inseminación Artificial.

EVALUACION FINAL

- 1.- ¿Qué es transferencia embrionaria, qué usos se le puede dar y cuáles son sus ventajas?
- 2.- ¿Qué es hiperovulación y qué hormonas se usan?
- 3.- ¿Qué es sincronización y cómo la realizas?
- 4.- ¿Cuáles son los métodos de recolección más recomendables?
- 5.- ¿Cuándo realizas la recolección de embriones?
- 6.- ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de los métodos de recolección Quirúrgico y No Quirúrgico?
- 7.- ¿Cuál es la nomenclatura que se usa para embriones de acuerdo a los días que tiene, y a su calidad?
- 8.- ¿Cuándo recomiendas realizar la transferencia y dónde depositas al embrión?
- 9.- ¿Cuáles son las técnicas de transferencia?
- 10.- ¿Cuáles son los métodos de conservación y -- cuánto tiempo se pueden conservar los embriones?
- 11.- ¿Qué características debe tener el medio para conservar los embriones "in vitro"?
- 12.- ¿Qué agente protector para congelación puedes usar y qué concentración se usa?
- 13.- ¿Cuáles son los porcentajes de preñez obtenidos con embriones congelados?
- 14.- ¿Qué recomendarías para establecer la tecnología de transferencia embrionaria en el país?

RESPUESTAS AL CUESTIONARIO GENERAL

1.- Transferencia de embriones es la técnica por la cual se extraen los óvulos fecundados de una vaca que fue hiperovulada, y se implantan en otras que están en la misma etapa del ciclo estral, para que lleven a término una gestación.

2.- Se usa para aumentar el número de descendientes de una vaca que es genéticamente superior, sus ventajas son:

Aumenta el número de hijos de animales con características deseables, influencia el mérito genético del hato, se aumenta el número de animales de raza exótica, al usar vacas prepúberes, se disminuye el intervalo entre generaciones, se puede aumentar el número de partos gemelares, y en un futuro están abiertas las posibilidades de sexar embriones, producir gemelos idénticos y copias exactas (clones), con el desarrollo de la técnica de congelación se pueden transportar embriones internacionalmente, lo cual resulta más económico, y se conservan para utilizarse en el momento óptimo.

3.- La aplicación de 1500 U.I. de PMSG por vía intramuscular, el día 21 del ciclo estral. Otro es también PMSG en la misma dosis entre el día 8-14 seguida por PgF α entre 48 y 72 horas después. También se usa FSH 5 mg entre el día 8 y 14 del ciclo estral disminuyendo 1 mg diario por 5 días, PgF α se puede usar el tercer día que se aplica FSH.

4.- El uso de LH y HCG ayudan a la presentación del celo pero las prostaglandinas son las mejores para sincronizar el ciclo, se usa PgF α 30 mg entre 12 y 18 horas antes de las receptoras.

5.- Se puede usar Inseminación Artificial o monta directa. Con Inseminación Artificial se recomienda dar tres Inseminaciones, la primera 12 horas después de que es detectado el estro, con 1 ó 2 dosis; la segunda se dá a las 12 horas de la primera con 2 dosis y la tercera 12 horas más tarde -- con una dosis. Con la monta directa también se dan tres servicios, en ambos casos se debe tener especial cuidado en la limpieza y se debe checar la calidad del semen.

6.- Es el método por el cual se extraen los embriones del tracto genital femenino, antes de que sean implantados.

7.- Son dos los tipos de recolección en Quirúrgico y el No Quirúrgico.

EL QUIRURGICO se hace bajo anestesia general, se hace una incisión en la línea media de 15 cm. y se exponen el útero y los ovarios. Se obstruye el cuerno cerca del cuerpo, y se incerta un pequeño tubo de goma en la fimbria, el medio se introduce en el lumen del cuerno uterino, con la ayuda de una jeringa, se masajea el útero y se extrae el líquido por el oviducto. Se procede igual con el otro cuerno, el líquido se incuba a 37°C.

En el método NO QUIRURGICO se usa anestesia epidural, se coloca a la vaca con las patas traseras ligeramente más abajo y se hace asepsia de la región Perineal. Para recolectar los embriones se usa un sistema de tres canales uno sirve para inflar un globo que tapa la salida del cervix el otro para introducir el líquido y el tercero para extraerlo.

Se introducen en el útero a través del cervix, se infla el globo se introduce el líquido, se masajea el cuerno por el recto y se extrae el líquido, se repite varias veces hasta completar 300-800 ml. de medio, después se introduce -

en el otro cuerno, y se repite el proceso.

8.- Debe ser estéril, contener antibióticos, proteínas, sales y un pH adecuado, se debe mantener a 37°C, puede contener suero fetal bovino o suero sanguíneo.

9.- Se toma en cuenta que esté fertilizado, esto se distingue porque un óvulo sin fecundar es una simple masa de vitelo rodeado de la zona pelúcida. La presencia de blastómeros de igual talla variando en número de 4, 8, 16, 32, dentro de la zona pelúcida es señal de fertilización o normal desarrollo. Los blastómeros irregulares, pérdida de ellos, masas celulares deformes, vacuolas en el citoplasma, zona pelúcida rota o vacía, son las anomalías que se presentan y estos embriones no deben ser transferidos.

10.- La transferencia se debe hacer cuando el embrión tiene 5 días o más, debemos tomar en cuenta que el cuerpo lúteo de las receptoras no produce progesterona sino hasta el día 4, entonces se debe transferir el embrión después de este tiempo cuando el endometrio está bajo la influencia de la progesterona.

11.- Los métodos de transferencia son el QUIRURGICO y el NO QUIRURGICO.

12.- A 4°C se pueden mantener por 5 días.

A 37°C en incubadora por 24-48 horas ó más pero los índices de preñez bajan.

13.- Por medio de la transferencia de embriones se aumenta la calidad genética de un hato, para la introducción de razas exóticas, es más fácil y económica la transferencia de embriones que el transporte de una gran cantidad de animales, además de que se reducen los problemas de inadaptabilidad, es el paralelo de la inseminación artificial del macho, y juntos ofrecen un camino más rápido para multiplicar los -

animales de características deseables, o para obtener razas puras que con los programas de cruzamiento convencionales.

14.- Debe tener superioridad genética en características deseables y eficiencia reproductiva, una donadora joven produce más embriones de calidad para ser transferidos, no debe tener anomalías en el tracto reproductor, concebir con uno o dos servicios, exhibir ciclos estrales regulares, no tener historia de distosia o retención placentaria, estar libre de enfermedades y tener buen estado nutricional.

15.- Se deben seleccionar con buena talla y amplia pelvis, las vacas jóvenes son también mejores, y deben tener todas las características que se mencionaron para las donadoras.

RESPUESTAS DEL CUESTIONARIO No. 1

HIPEROVULACION Y SINCRONIZACION

- 1.- Es el incremento de la respuesta ovulatoria normal.
- 2.- Gonadotropina, PMSG y FSH parcialmente purificada.
- 3.- Se usan LH, HCG y prostaglandinas como PgF para que se produzca luteolisis. Se le llama Sincronización.
- 4.- En el día 16 del ciclo estral.
- 5.- Se usan 1500 U.I.
- 6.- Se usan de 25 a 30 mg de PgF₂ por vía intramuscular.
- 7.- Con la aplicación de PgF entre 12 y 18 horas antes que la donadora.
- 8.- El día 10 del ciclo, un día antes o un día después.

HIPEROVULACION Y SINCRONIZACION

- 1.- Es el incremento de la respuesta ovulatoria normal.
- 2.- Gonadotropina, PMSG y FSH parcialmente purificada.
- 3.- Se usan LH, HCG y prostaglandinas como PgF para que se produzca luteolisis. Se le llama Sincronización.
- 4.- En el día 16 del ciclo estral.
- 5.- Se usan 1500 U.I.
- 6.- Se usan de 25 a 30 mg. de PgF por via intramuscular.
- 7.- Con la aplicación de PgF entre 12 y 18 horas antes que la donadora.
- 8.- El día 10 del ciclo, un día antes o un día después.

RESPUESTAS DEL CUESTIONARIO No. 2

METODOS DE RECOLECCION DE EMBRIONES

1.- El sacrificio de las vacas donadoras, la extracción de los órganos reproductores, el método QUIRURGICO y el NO QUIRURGICO.

2.- El sacrificio del animal donador y la extracción de los órganos reproductores.

3.- Después del día cinco.

4.- En el área media anterior a la ubre y de unos 15 - cm. dependiendo del tamaño de la vaca.

5.- Tienes que mencionar todos estos puntos.

- Anestesia.
- Lavado, rasurado y desinfección.
- Incisión.
- Exposición de los órganos reproductores.
- Obstrucción del útero.
- Introducción del medio por la fimbria.
- Extracción del medio por la pared del útero.
- Deposición en cajas de vidrio.
- Observación y mantención a 37°C.

6.- Se usa medio de cultivo celular 199 (CC 199), y -- Dulbecco's Salino Fosfotado y Buferado con suero Fetal Bovino del 10 al 20%.

7.- Anestesia Epidural baja, para evitar el forcejeo.

8.- La extracción se hace entre los días 6 y 11.

9.- Son unas mangueras de Latex, que tienen dos o tres canales en uno de esos tienen un globo que se encuentra al final y que se infla para obstruir la salida del líquido. -- Con la de dos canales se introduce y extrae el líquido por el canal que queda libre, y la de tres canales se utiliza -- uno para extraer y otro para introducir el medio.

10.- Tienes que mencionar todos estos puntos.

- Colocar a la vaca en declive.
- Anestesia Epidural Baja.
- Desinfección de la región perineal.
- Localización de los órganos a través del recto, y revisión del ovario para palpar la respuesta ovárica, al tratamiento hiperovulatorio.
- Introducción del Cateter Foley, con inflado del globo.
- Introducción del medio con ligero masaje.
- Extracción del medio colocandolo en cajas de cristal y manteniendolo a 37°C.
- Al terminar se inunda, el útero con una solución con Penicilina y Estreptomicina.

11.- Tienes que mencionar todos los puntos de la tabla 2.2. además de que el QUIRURGICO es más costoso.

RESPUESTAS DEL CUESTIONARIO No. 3

EVALUACION DE LOS EMBRIONES

- 1.- Tiene un diámetro de 150-190 μ .
- 2.- La zona pelúcida es de 12-15 μ m.
- 3.- En la etapa de Blastócisto expandido (8 días)
- 4.- Morula, Morula compacta, Blastócisto, Blastócisto expandido, Blastócisto libre.
- 5.- MORULA 5 días
MORULA COMPACTA 6 días
BLASTOCISTO 7 días
BLASTOCISTO EXPANDIDO 8 días
BLASTOCISTO LIBRE 9 días
- 6.- EXCELENTE. Esférico, simétrico; todas sus células son de tamaño, color y textura uniformes.

BUENO. Posee imperfecciones triviales, tales como pocos blastómeros rugosos, de forma irregular y con pocas vesículas.

REGULAR. Con problemas definidos pero no severos, blastómeros extrarrugosos, vesiculación más marcada y pocas células degeneradas.

MALO. Numerosos blastómeros rugosos, células degeneradas, variantes de tamaño, con un gran número de vesículas, pero la masa celular tiene apariencia viable.

RESPUESTAS DEL CUESTIONARIO No. 4
TIEMPO Y TECNICAS DE TRANSFERENCIA.

1.- Edad y desarrollo embrionario.

Grado de sincronización entre donadora y receptora.

Grado de sincronización entre receptora y embrión.

2.- Cuando son de menos de ocho células (2-4 días después de la ovulación) se deposita en el oviducto.

Cuando son de más de ocho células se depositan en el cuerno uterino.

3.- Porque el cuerpo Lúteo de la receptora no produce progesterona sino hasta el día 4 después de la ovulación, y así el embrión tiene un ambiente más hospitalario.

4.- Se define como del mismo lado.

5.- QUIRURGICO por incisión en la línea media.

QUIRURGICO por incisión en el flanco.

NO QUIRURGICO con pistola Causou para Inseminación Artificial.

NO QUIRURGICO con pipeta de Inseminación Artificial y tubo de poliuretano.

6.- Transferencia Quirúrgica por incisión en la línea media.

- Preparación de la receptora para cirugía, con ayuno, anestesia general, lavado, depilación y desinfección de la región media anterior a la ubre.

- Incisión en la línea de aproximadamente 15 cm.

- Exposición del útero y localización del cuerpo

lúteo, para realizar de ese lado la - - -
transferencia.

- Transferencia en el extremo cercano al oviducto, se deposita cuidadosamente en el lúmen del cuerno con la ayuda de una pipeta Pasteur.
- Sutura de la incisión y cuidados postoperatorios. Transferencia Quirúrgica con incisión en el flanco.
- Palpación de la receptora por vía rectal - para localizar el cuerpo lúteo y realizar la transferencia de ese lado.
- Se aplica anestesia regional, con lavado, - depilación y desinfección de la fosa sublumbar del lado que se encuentra el cuerpo lúteo.
- Se exterioriza el cuerno uterino y se deposita el embrión en el lumen del extremo del -- cuerno cercano al oviducto con la ayuda de - una pipeta Pasteur y una micropipeta.

Transferencia NO QUIRURGICA con pistola Cassou.

- Se introduce el embrión en una pipeta encerrado entre dos burbujas de aire, y se carga la pistola como para Inseminación Artificial.
- Se palpa a la receptora para localizar el -- cuerpo lúteo.
- Se lava y desinfecta la región perineal.
- Se aplica anestesia epidural.
- Se introduce la pistola como para Inseminación Artificial, hasta alcanzar la mitad del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo y se deposita suavemente el embrión.

Transferencia NO QUIRURGICA con pipeta de Inseminación Artificial y tubo de poliuretano.

- Se hace un agujero de 1 mm. en el tubo de -- poliuretano, y se introduce el embrión en el tubo encerrado entre dos burbujas de aire.
- Se introduce el tubo en la pipeta de Inseminación Artificial, teniendo cuidado de que el agujero quede en el final de la pipeta.
- Se palpa a la receptora para localizar el -- cuerpo lúteo y realizar de ese lado la transferencia.
- Se lava y desinfecta la región perineal.
- Se introduce la pipeta a través del cérvix -- hasta alcanzar la parte media del cuerno --- ipsilateral al cuerpo lúteo.
- Se endereza la pipeta y se empuja el tubo -- poliuretano hasta el extremo del cuerno cercano al oviducto donde se deposita el embrión.
- Se saca la pipeta sosteniendo el tubo de poliuretano para no causar daño.

7.- Se influencia por:

- Edad del embrión y calidad del mismo.
- Sitio de posición.
- Destreza de operador.
- Grado de sincronización.

8.- Los puntos a tomar en cuenta para realizar la --- transferencia son:

- 1.- Palpar a la receptora 2 días antes para conocer la formación, talla y lado del cuerpo lúteo, evitando así la excesiva manipulación del tracto al tiempo de la transferencia.
- 2.- La limpieza y esterilización de la ope-

ración son muy importantes, porque el útero en esta fase del ciclo es altamente susceptible a infecciones.

- 3.- La destreza y la paciencia del operador son importantes para lograr altos porcentajes de preñez y poco daño en el tracto.
- 4.- La anestesia epidural ayuda a efectuar la operación.
- 5.- La dilatación esta contraindicada porque aumenta la posibilidad de infección.

RESPUESTAS DEL CUESTIONARIO No. 5

CONSERVACION DE EMBRIONES

1.- A temperatura ambiente por pocos períodos de tiempo, en el oviducto ligado de un conejo también por períodos de tiempo cortos, a temperatura entre 0° y 10°C se conservan por varios días, y en congelación por varios meses.

2.- Se debe adicionar Suero Fetal Bovino del 5-20%.

- Se debe adicionar antibióticos y fungicidas.

- Se debe pasar primero por un filtro milipore con poros de 0.45 de diámetro y después por otro con poros de 0.22 de diámetro.

- Se debe mantener un pH adecuado (entre 7.2 y 7.6).

- Se debe mantener una atmósfera de 5% de CO₂.

- Se debe mantener una osmolalidad entre 230 y 320 mOsm/Kg

- Se debe preparar con agua pura y desionizada.

3.- El desarrollo de los embriones "in vitro" es aproximadamente 2/3 partes más lento, que los embriones "in vivo".

4.- De 2-3 días pero los porcentajes de preñez disminuyen.

5.- Transferirlos provisionalmente al oviducto ligado de un conejo.

6.- Se usa Solución Salina Fosforada, y Bufferada y el agente protector es dimetilsulfoxido (DMSO).

7.- Se usa una concentración de 1.5 M DMSO, se añade en tres etapas, que son:

0.5 M de DMSO por 10 minutos

1.0 M de DMSO por 10 minutos.

1.5 M de DMSO por 20-30 minutos.

8.- Se seleccionan los embriones y se mantienen en SFB con 20% de suero fetal bovino y 1.5. M de DMSO.

- Se introducen de 2 a 5 embriones en un frasco ampula de vidrio con 0.25 ml. del medio (1.5 DMSO-SFB) y se espera de 20-30 minutos como periodo de equilibrio.
- Se tapan los frascos y se colocan en un congelador programable para enfriarse de la temperatura ambiente a -7°C a una velocidad de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Cuando está a -7°C se introduce una aguja previamente enfriada en Nitrógeno líquido por la pared del frasco, para inducir la formación de cristales.
- Se continúa la congelación hasta -30°C a una velocidad de $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- De -30°C se enfría a una velocidad de $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y cuando alcanza los -33°C se sumergen en Nitrógeno Líquido (-196°C) así pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo.

9.- Se descongelan en baño de agua caliente a 25°C .

10.- El DMSO se elimina en seis etapas:

1.5 M DMSO por 5 minutos.

1.25 M DMSO por 10 minutos.

1.0 M DMSO por 10 minutos.

0.75 M DMSO por 10 minutos.

0.50 M DMSO por 10 minutos.

0.25 M DMSO por 10 minutos, y finalmente en medio frasco SFB con 20% de suero fetal bovino, se cultiva por varias horas, se evalúan y si son viables pueden ser transferidos.

11.- Los porcentajes de preñez son del 25 al 40% pero se han reportado porcentajes hasta de un 70%.

12.- Fue reportado en 1972 y fue ratón.

RESPUESTAS A LA EVALUACION FINAL

1.- Transferencia embrionaria es la técnica por la cual se extraen los óvulos fecundados de una vaca que ha sido hiperovulada, para implantarlos en otra que se encuentra en la misma etapa del ciclo estral, para que lleve a término una gestación. Se usa para aumentar el número de descendientes de una vaca es que genéticamente superior, tiene ventajas como influenciar el mérito genético del hato, aumentar el número de animales de razas extranjeras, puede disminuir el intervalo entre generaciones cuando se usan vacas prepubes, se puede aumentar el número de partos gemelares, se podrá realizar rutinariamente el sexado de los embriones, se podrá también producir gemelos idénticos y cuádruples así como clones. (copias exactas de un animal).

2.- Hiperovulación es el aumento de la respuesta ovulatoria normal, se usan gonadotropinas, PMSG y FSH parcialmente purificada.

3.- Es el método por el cual se puede controlar el tiempo de ovulación y la aparición del estro, se usan LH, HCG y prostaglandinas como $PgF_{2\alpha}$ que produzcan luteólisis. Se usan 30 mg. de $PgF_{2\alpha}$ por vía IM en dosis repetidas entre 12 y 18 hrs., antes a la receptora que a la donadora.

4.- El método QUIRURGICO y el NO QUIRURGICO.

5.- Después del día 5 de aparecido el estro.

6.- El método Quirúrgico tiene la ventaja de poder obtener un número mayor de óvulos; también se puede evaluar el número de folículos que se desarrollan así como alguna patología en el tracto. Como desventajas contamos que se usa anestesia general que implica riesgo para la vida del animal, el sujetar a la vaca es indispensable, hay también un

alto riesgo de complicaciones postoperatorias y reproductivas y tiene poca posibilidad de realizarse en las granjas. - Las ventajas del método No Quirúrgico son:

Que es más barato.

La sujeción no es indispensable.

Se realiza con anestesia epidural.

Hay poco riesgo de complicaciones en la donadora, y puede realizarse en la granja.

Las desventajas son:

La poca habilidad para detectar alguna patología en el tracto, y la de precisar el número de óvulos, así como la capacidad de recobrar todos los embriones que es aún limitada.

7.- MORULA	5 días
MORULA COMPACTA	6 días
BLASTOCISTO	7 días
BLASTOCISTO EXPANDIDO	8 días
BLASTOCISTO LIBRE	9 días

De acuerdo a su calidad de EXCELENTE, BUENO, REGULAR -- y MALO.

8.- Después del día 5 y se deposita en el extremo del cuerno.

9.- Las técnicas de transferencia son:

Por insición en la línea media.

QUIRURGICA

Por insición en el flanco.

Con pistola de Caussou para I.A.

NO QUIRURGICA

Con pipeta de I.A. y tubo de po liuretano.

10.- A temperatura ambiente por pocos períodos de tiempo.

Entre 0° 10°C por varios días.

Congelados en nitrógeno líquido (196°C) por varios meses.

11.- Debe contener suero fetal bovino.

Se le debe adicionar antibióticos.

Estar libres de bacterias.

Mantener un pH adecuado (7.2-7.6)

Mantener una osmolalidad entre 230-320 mOsm/kg.

Prepararse con agua pura.

12.- Dimetilsulfoxido (DMSO), en una concentración de 1.5 M de DMSO, se añade en tres etapas, 0.5 M de DMSO por 10 minutos, 1.0 M DMSO por 10 minutos, 1.5 M DMSO por 20-30 minutos.

13.- Del 25 al 40% pero se han reportado hasta 70%.

14.- Se recomienda:

a) Fomentar el estudio y la investigación de la técnica para mejorarla y hacerla más práctica y menos costosa.

b) Hacer un programa de difusión cultural para que veterinarios, técnicos pecuarios y ganaderos conozcan sus ventajas,

c) Organizar cursos de adiestramiento para preparar a veterinarios y técnicos.

d) Establecer centros que proporcionen el servicio a las personas que lo soliciten.

e) Establecer bancos de embriones congelados, que provengan de vacas seleccionadas, pa-

ra la distribución a los productores.

f) Establecer un hato de donadoras de exce
lente calidad para distribuir a los bancos.

g) Establecer un centro de enseñanza e in
vestigación continua sobre transferencia e in
seminación Artificial.

h) Obtener crías machos para ser probados
en los centros de Inseminación Artificial.