

LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN EL GANADO VACUNO



L. F. GOSALVEZ LARA
Dr. Ingeniero Agrónomo
A. VIDAL LUIS
Licenciado en Veterinaria



El objetivo de esta Hoja Divulgadora no es en absoluto que el ganadero pueda aplicar la técnica de transferencia de embriones personalmente en su rebaño. La razón por la que no perseguimos este objetivo se debe a que la técnica es instrumental y metodológicamente de una gran complejidad. En nuestro ánimo sí está, sin embargo, el poder ofrecer al ganadero toda la información necesaria para que pueda tener las ideas claras y un criterio bien formado a la hora de analizar si la aplicación de esta técnica en sus condiciones de explotación puede ser mejorante para su ganadería.

Queremos agradecer a don Jaume Claverol, a don Santos Estavillo y a don Marc Tor su colaboración en este trabajo.

INDICE

	Págs.
1. INTRODUCCION	
1. 1. Reseña histórica.....	3
1. 2. Ventajas e inconvenientes	4
1. 3. Nociones de anatomía y fisiología de la vaca y del embrión	6
1. 4. Principal legislación	9
2. LA TECNICA	
2. 1. Selección de vacas donantes y receptoras	11
2. 2. Producción de embriones.....	12
2. 3. Recogida de los embriones	13
2. 4. Estudio del embrión.....	17
2. 5. Deposición o colocación de los embriones.....	20
2. 6. Resultado	22
3. CONSERVACION DE EMBRIONES	
3. 1. Método de congelación convencional	24
4. CONCLUSIONES	27
5. BIBLIOGRAFIA.....	28



LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN EL GANADO VACUNO

1. INTRODUCCION

1.1. Reseña histórica

Las primeras transferencias de embriones las efectuó HEAPE en coneja, entre los años 1891 y 1897; con ellas se inició la técnica de transferencia embrionaria (T. E.) de forma cruenta; ésta se realiza mediante una incisión en el abdomen por la que poder extraer y trabajar con el aparato reproductor de la hembra. Posteriormente, la T. E. se generalizó en las restantes especies domésticas; VILLEY consiguió en el año 1951 el primer ternero nacido de una transferencia; en esa misma década, otros investigadores como ROWSON y AVARILL obtuvieron varios nacimientos de embriones trasplantados por vía cruenta.

En la década de los 60 se desarrolló la transferencia embrionaria en la vaca por la vía incruenta o «blanca» (sin incisión abdominal), lográndose ya en el año 1965 óptimos resultados. Este ha sido el método por el que se ha desarrollado la T. E. en el ganado vacuno y por el que se han logrado numerosos éxitos.

En la pasada década se ha generalizado el uso de este método en la especie bovina a nivel mundial, llegando a ser tan elevado el número de embriones transferidos cada año, como lo demuestra el haber pasado de unos 100.000 en 1983 a más de 500.000 en 1988. Destaca especialmente Norteamérica, ya que entre U. S. A. y Canadá se realizaron en 1986 más del 60 por 100 de las transferencias mundiales. En Europa occidental la técnica estaba menos difundida, efectuándose unas 35.000 en 1986 y alcanzando las 50.000 en 1989. Los países europeos que destacan en la técnica son Alemania, Francia, Gran Bretaña y Holanda.

1.2. Ventajas e inconvenientes

Como argumentos favorables para el empleo de la T. E. se pueden citar los siguientes:

GENETICO: La T. E. se puede emplear para la mejora genética de las vacas de un rebaño; para ello es necesario depositar en la vaca receptora los embriones formados por una vaca de élite, cubierta por un toro también de calidad. Ahora bien, es necesario considerar que para la mejora genética de una explotación siempre será más barato y más sencillo manejar las cualidades paternas (eligiendo las dosis para inseminación artificial) que las maternas con la T. E.

Dentro de este apartado cabe mencionar las ventajas de poder transportar razas con facilidad, defender y conservar especies. También es posible fomentar el número de partos gemelares transfiriendo, a los 7-8 días poscoito, un embrión en el cuerno contrario al que se implanta el propio de la vaca receptora; a pesar de ello, resulta obligado recordar que el problema del freemartinismo (vaquillas blancas) es muy frecuente en el ganado vacuno, siendo estériles aproximadamente el 90 por 100 de las novillas nacidas en partos, con gemelos de ambos sexos.

SANITARIO: Desde este punto de vista, la T. E. tiene la ventaja de que el embrión no es transmisor de enfermedades infecciosas (por ejemplo, la brucelosis), por lo que puede servir de ayuda a la hora de conservar material genético de una granja en la que se deban eliminar todos los efectivos por motivos sanitarios.

INVESTIGADOR: Esta técnica es imprescindible para poder plantear nuevas tecnologías en las que se manipula genéticamente el embrión.

Las desventajas de la T. E. están relacionadas con su aplicación práctica, ya que el ganadero puede encontrar los siguientes inconvenientes:

DE LA GESTACION: El hecho de que una vaca tenga que ser el soporte de los embriones mientras éstos se desarrollan durante una gestación y, por lo tanto, no se pueda prescindir de ella en la



explotación (como de los toros en la inseminación artificial), implica que el interés real de la técnica se basa en la mejora productiva que pueda suponer el material genético que se transfiere.

DE SU DIFICULTAD. La complejidad tanto del método como del material empleado en la T. E. requieren una meticulosidad y pulcritud difíciles de conseguir en condiciones normales de una granja y por personal no cualificado.

DE SU COSTE. La T. E. tiene un elevado precio tanto por el material empleado como por el personal técnico que la debe efectuar, debiéndose considerar, además del precio del embrión, el porcentaje de fertilidad y viabilidad del mismo. Actualmente, el coste que tiene para un ganadero el que una de sus vacas geste embriones de una calidad genética superior es tan elevado como para cuestionar su rentabilidad económica. Sin embargo, en los últimos años, como consecuencia de los avances y generalización de la técnica, existe una tendencia a reducir el precio de la misma, tal y como lo muestra el hecho de que en 1988 una novilla nacida por T. E. costaba en Francia o Alemania entre 80.000 y 100.000 pesetas, precio similar al que actualmente, seis años después, se sigue manteniendo por las empresas especializadas en el caso de embriones de una cierta calidad.

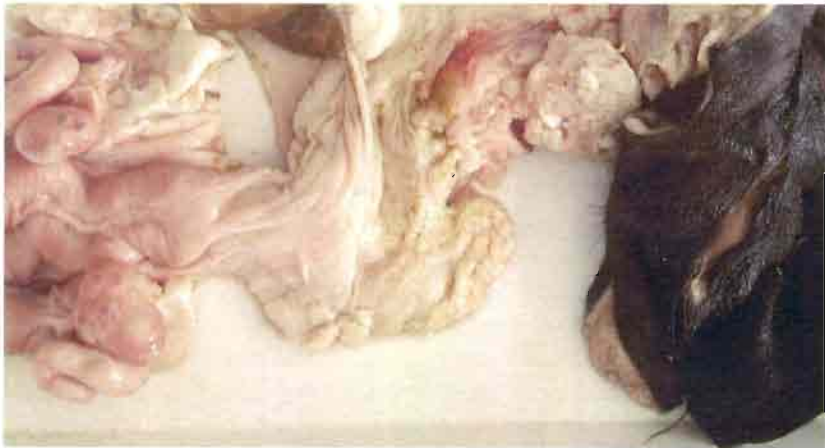


Fig. 1.—Aparato reproductor de la vaca, a la derecha se observan ano y vulva, a la izquierda cuernos uterinos y ovarios.

1.3. Nociones de anatomía y fisiología de la vaca y del embrión

Anatomía

El aparato reproductor de la vaca (figura 1) está formado por:

Ovarios. En ellos se encuentran los gametos femeninos, llamados ovocitos (popularmente óvulos), cada uno dentro de una formación de mayor tamaño denominada folículo. Algunos ovocitos salen del ovario por un proceso llamado ovulación, que ocurre solamente al final del celo. Una vez sale un ovocito del ovario, para formar un embrión se debe unir a un gameto masculino en las zonas altas del aparato reproductor de la hembra. En el folículo, sin el ovocito (después de la ovulación), se forma una estructura llamada cuerpo lúteo, que tiene por misión producir una hormona (progesterona) que posibilitará y defenderá, en el caso de que se haya formado el embrión, su implantación y gestación en el útero materno.

Cada ovario tiene un peso y dimensiones variables, según edad y situación fisiológica en la que se encuentra el animal; a título orientativo podemos decir que, sin tener cuerpos lúteos, pesa unos 15 gramos y tiene unas dimensiones medias de dos por cuatro centímetros.

Oviductos. Son los conductos que recogen y transportan al ovocito una vez sale del folículo. En ellos ocurre la fecundación y se inicia la formación del embrión. Tienen una longitud total entre 25 y 30 centímetros.

Útero. En la vaca, el útero o matriz es del tipo bicornes; sus dimensiones dependen de las gestaciones que haya tenido el animal. Se compone de un cuerpo muy corto (unos 2-5 centímetros de longitud) y de dos cuernos que parten de éste, con unos 20-25 centímetros de longitud. En la vaca, como en los otros rumiantes, el endometrio (capa que tapiza interiormente el útero) presenta unas protuberancias denominadas carúnculas, que colabo-



ran a formar los cotiledones placentarios con los que se relacionará el feto con su madre.

Vagina. Está conectada con el útero por una estructura anatómica llamada «cervix», que tiene una longitud media de 20 centímetros. La vagina es muy amplia y presenta un himen que marca claramente la separación entre fondo y vestíbulo vaginales; su longitud total es de unos 30 centímetros.

Fisiología

El ciclo estral u ovárico de la vaca dura aproximadamente veintidós días y presenta cuatro fases (figura 2). En el *estro*, la vaca manifiesta los síntomas de celo o «calores», produciéndose, al final de la fase, la salida del ovocito (por la influencia de la hormona LH), de cada folículo que haya concluido su maduración. En el *metaestro*, si ha habido fecundación, se genera el embrión, al mismo tiempo se forman el/los cuerpos lúteos, a partir de los

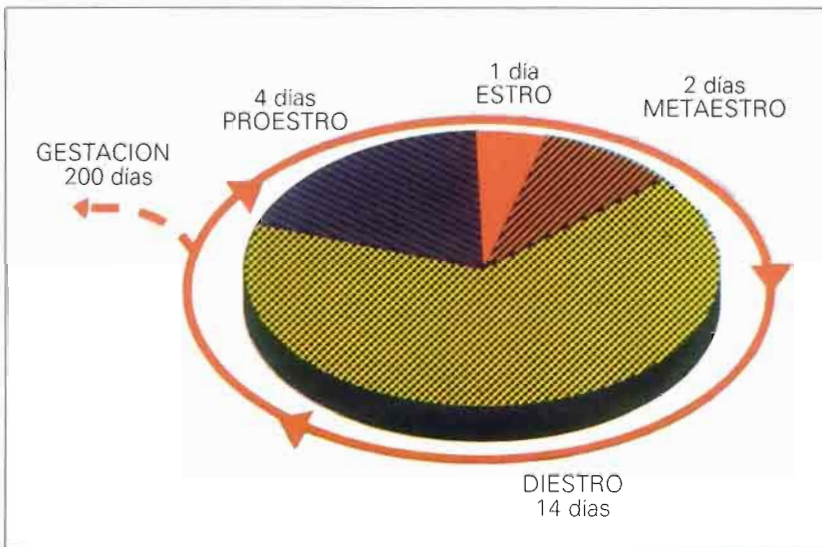


Fig. 2.—En el ciclo estral, las cuatro fases se suceden sin interrupción según el orden que indica la flecha. El ciclo termina si ocurre una fecundación. (Las cifras son duración media en días).

folículos que hayan ovulado. En el *diestro* se permitirá, durante unos quince días, que los embriones se implanten en el endometrio y comience así la gestación. Si no hubiera embriones implantados, al final del diestro se destruyen el o los cuerpos lúteos, continuándose el ciclo. En el *proestro* se preparan (maduración) unos cuantos folículos con el objetivo de liberar cada uno su ovocito; este proceso se produce bajo la influencia de una hormona llamada FSH. El tamaño y actividad de los mayores folículos, determinará el paso al *estro* siguiente, con lo que se habrá cerrado el ciclo.

Además de con la gestación, el ciclo en la vaca se rompe con una cierta frecuencia, presentándose anoestros (falta de celo) más o menos pronunciados; este fenómeno se da bastante en las vacas de carne, presentando los celos estacionales. También son frecuentes los llamados «celos silenciosos», durante los que la vaca no manifiesta o lo hace de una forma muy débil, los calores (estro); este fenómeno es habitual en el primer ciclo después del parto en las vacas lecheras.

Tabla 1. CRONOLOGIA DEL DESARROLLO DEL EMBRION BOVINO

Situación	Horas	Día	Lugar
Comienzo calores	0	0	Ovario
Pico LH	8-12	0	
INSEMINACION O MONTA			
Ovulación	30-32	1	Oviducto
Fecundación	33-34	1	
Embrión de dos células	46-56	2	
Embrión de ocho células	66-90	3	
Mórula de 16-32 células	90-125	4	
Mórula de 32-64 células	125-145	6	
Blastocisto temprano	145-175	7	U t e r o
Blastocisto	175-210	8-9	
Salida de pelúcida (eclosión)		10	
Comienzo elongación		11	
Comienzo relación con endometrio		16	
Implantación		35	



Embrión

El desarrollo embrionario sigue un calendario bastante preciso (tabla 1). Una vez que se unen los dos gametos (fecundación) en el oviducto, forman una sola célula y ésta se multiplica, dando lugar a todas las restantes del embrión. El embrión pasa al útero cuando tiene entre 32 y 64 células (mórula); a partir de este momento pasa a llamarse blastocisto y desde el décimo día desde el inicio de los calores comienzan una serie de procesos que tienen como finalidad formar la placenta que le permite implantarse en el útero.

1.4. Principal legislación

En este apartado pretendemos ofrecer reseña de las principales normas dictadas en el Estado español y en la Unión Europea, de cumplimiento en la transferencia de embriones en el ganado vacuno.

O. M. de 16 de abril de 1990 («BOE», 21-4-90). Por la que se actualizan las condiciones zootécnicas para el comercio intracomunitario y con terceros países de reproductores y material genético bovino de raza pura.

R. D. 855/1992 («BOE», 4-8-92). Por el que se regulan las condiciones de control sanitario en los intercambios intracomunitarios y en las importaciones de terceros países, de embriones y de animales domésticos de la especie bovina.

La Unión Europea (UE), en su «Diario Oficial», ha publicado en los últimos años las siguientes normas que se refieren a los embriones bovinos:

Directiva 89/556/CEE del Consejo, de 25 de septiembre de 1989, relativa a las condiciones de política sanitaria aplicable a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones procedentes de terceros países de embriones de animales domésticos de la especie bovina.

Decisión 91/270/CEE de la Comisión, de 14 de mayo de 1991, por la que se establece la lista de terceros países de los que

los Estados miembros autorizan la importación de embriones de animales domésticos de la especie bovina.

Directiva 92/65/CEE del Consejo, de 13 de julio de 1992, por la que se establecen las condiciones de política sanitaria aplicables a los intercambios y las importaciones en la Comunidad de animales, esperma, óvulos y embriones, no sometidos, con respecto a estas condiciones, a las normativas comunitarias específicas a que se refiere la sección I del Anexo A de la Directiva 90/425/CEE.

Decisión 92/452/CEE de la Comisión, de 30 de julio de 1992, por la que se establecen las listas de equipos de recogida de embriones autorizados en terceros países para exportar a la Comunidad embriones de la especie bovina.

Decisión 92/471/CEE de la Comisión, de 2 de septiembre de 1992, relativa a las condiciones de política sanitaria y a la certificación veterinaria para la importación de embriones de la especie bovina procedentes de terceros países.

Decisiones 93/574/CEE y *93/677/CEE* de la Comisión, de 22 de octubre y de 13 de diciembre de 1993, respectivamente, en las que se modifica la Decisión 92/452/CEE.

Decisión de la Comisión, de 8 de febrero de 1994, en la que se modifica la Directiva 89/556/CEE.

Tal vez no sobra recordar aquí que una *Directiva* es una ley de la Unión Europea, vinculante a todos los Estados miembros, pero que cada país elige el procedimiento para su aplicación. Una *Decisión* es totalmente vinculante para aquel a quien va dirigida, sin requerirse legislación nacional de aplicación a los países a donde se dirige.

2. LA TÉCNICA

En este apartado se pretende dar una visión de todos los procesos que componen la técnica.



2.1. Selección de vacas donantes y receptoras

Es aconsejable para poder rentabilizar al máximo la T. E. que las hembras que ceden y reciben el material genético cumplan unas condiciones objetivas mínimas.

Las vacas donantes deben tener el mayor valor genético, zootécnico y productivo, siendo además sexual y genitalmente normales; esta última característica es especialmente interesante ya que, en ejemplares muy valiosos, sus índices productivos suelen ser reflejo de desequilibrios fisiológicos (ciclos irregulares, desajustes hormonales, etc.), que no interesa transmitir a la descendencia.

Las características que debe reunir una vaca receptora son las siguientes:

- Ser anatómica y funcionalmente normal.
- Presentar en el momento de la deposición un cuerpo lúteo funcional y bien desarrollado.



Fig. 3.—La transferencia de embriones se realiza principal, pero no exclusivamente, en rebaños de vacas lecheras.

2.2. Producción de embriones

En situación normal, una vaca produce solamente un óvulo en cada ciclo. Para mejorar el resultado económico de la técnica es interesante lograr el mayor número de óvulos de cada hembra por recogida, por lo que se aplican las técnicas denominadas de superovulación.

Superovulación

Normalmente, los tratamientos superovulatorios que se aplican en la T. E. se efectúan en el diestro, entre los días 9 y 12 del ciclo, ya que ello permite sincronizar el celo posterior de la vaca donante y las receptoras.

La superovulación se consigue estimulando el ovario de la vaca con hormonas de efecto biológico similar a las del mismo animal; las principales son:

PMSG, FSHp, HMG

Estas hormonas se administran por inyección intramuscular. La PMSG resulta la más barata y de más fácil aplicación (menos inyecciones), teniendo como inconveniente que induce anticuerpos, con lo que si se aplica en tratamientos repetidos sobre el mismo animal deja de producir estímulo. La HMG tiene un precio muy alto, por lo que sólo se emplea raramente

Se puede decir que la superovulación es uno de los puntos limitantes de la T. E., ya que la respuesta al tratamiento tiene mucha variabilidad individual y además el número medio de embriones que se suelen conseguir es reducido (4 ó 5). Este último punto se puede ilustrar con la tabla 2 (THIBIER, 1989).

Fecundación

En la transferencia embrionaria normalmente se fecunda la vaca donante por inseminación artificial (I. A.), ya que los nive-



Tabla 2. EMBRIONES RECOGIDOS EN ALEMANIA Y FRANCIA (año 1988)

	RFA	Francia
Hembras recolectadas	1.966	3.866
Embriones recogidos	18.775	29.547
Embriones transferibles	9.873	16.676
Embriones recogidos por hembra	9,5	7,6
Embriones transferidos por hembra	5,0	4,3

les de calidad y precisión requeridos difícilmente se pueden conseguir con monta natural. La I. A. se debe realizar a las doce horas del comienzo del celo inducido, siendo interesante efectuar una segunda inseminación a las doce horas de la primera. La deposición del semen es por vía transcervical (método americano), en los cuernos uterinos cerca del útero.

2.3. Recogida de los embriones

El líquido que se emplea para lavado y recogida de los embriones es una solución fisiológica llamada PBS, que contiene suero de plasma bovino. El PBS presenta unas características en cuanto a concentración de sustancias minerales y orgánicas, idóneas para el mantenimiento de la vida de las células del embrión.

La vía cruenta actualmente sólo se sigue para recoger embriones de menos de 16 células. Consiste en hacer un corte en el abdomen por el que se exterioriza el cuerno uterino del lado en el que aparece el cuerpo lúteo. El lavado se realiza haciendo dos incisiones en el cuerno, una por la que se inyecta y otra por la que se recoge el líquido PBS.

La vía incruenta es la que se sigue normalmente cuando se quiere recoger embriones que tengan entre seis y nueve días. Para este método se emplea una sonda de dos vías, del tipo Foley. Se comienza sujetando la vaca donante en un potro especial (figura 4), posteriormente, por palpación rectal y tras anestesia epidural con xilocaína, se sitúa la sonda de manera que se pueda in-



Fig. 4.—En los Centros se dispone de un armazón para sujetar a la vaca donante durante la recogida de los embriones.

Fig. 5.—Para soportar todo el material, excepto los frascos, conviene disponer de una mesa portátil.



Fig. 6.—Antes de poner la sonda se anestesia epiduralmente.

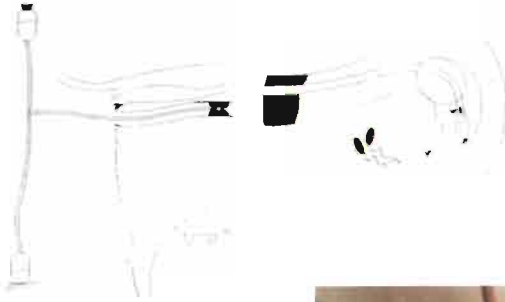


Fig. 7.—En cada cuerno uterino se deja el líquido (PBS) unos instantes en contacto con el endometrio; después se despinzan las gomas y se hace salir el PBS con ayuda de un masaje por vía rectal.

Fig. 8.—El paso del cervix se consigue sujetándolo firmemente y empleando una guía metálica que da rigidez a la sonda.

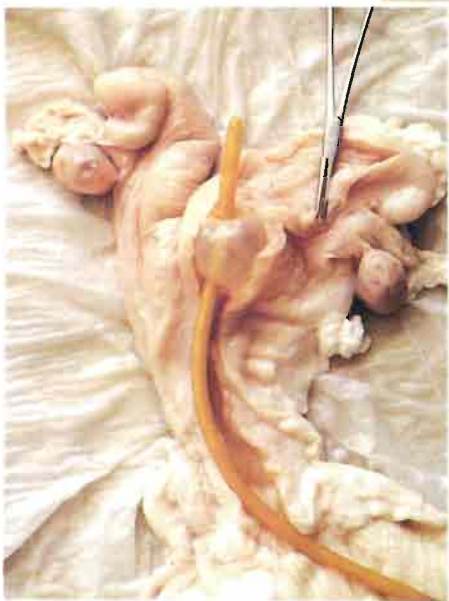


Fig. 9.—Una vez colocada la sonda en su lugar, se retira la guía y se infla con aire el globo de la misma, con lo que se consigue que la goma presione toda la pared uterina.

Fig. 10.—A veces se recogen los embriones en establo, siendo también necesario en estos casos tener una asepsia total.



Fig. 11.—El globo se infla, por la vía lateral (roja), empleando una jeringa. La vía central conecta con los tubos de goma, por los que pasa el PBS. Los tubos se pinzan con portas.



flar el globo de la misma en mitad del cuerno uterino. Una vez toca el globo toda la pared del cuerno se efectúa un barrido entrando el líquido de lavado, por gravedad, a través de la vía central de la sonda. Cuando está lleno el cuerno se cierra la entrada y se hace salir, pudiéndose ayudar con la mano desde el recto, por la misma vía de la sonda por la que entró (ver figuras). El líquido se recoge en un vaso de vidrio que tiene un fondo especial, en forma de cono invertido, y con una salida con llave en el extremo menor.

2.4. Estudio del embrión

Una vez se termina el lavado se deja sedimentar todo el líquido de recogida, de forma que en unos diez minutos los embriones, por su propio peso, queden en el fondo del frasco de recogida. Pasado este tiempo se extrae por el fondo del frasco el líquido, para colocarse en una placa Petri y poder buscar los embriones con una lupa binocular a 20/40 aumentos.

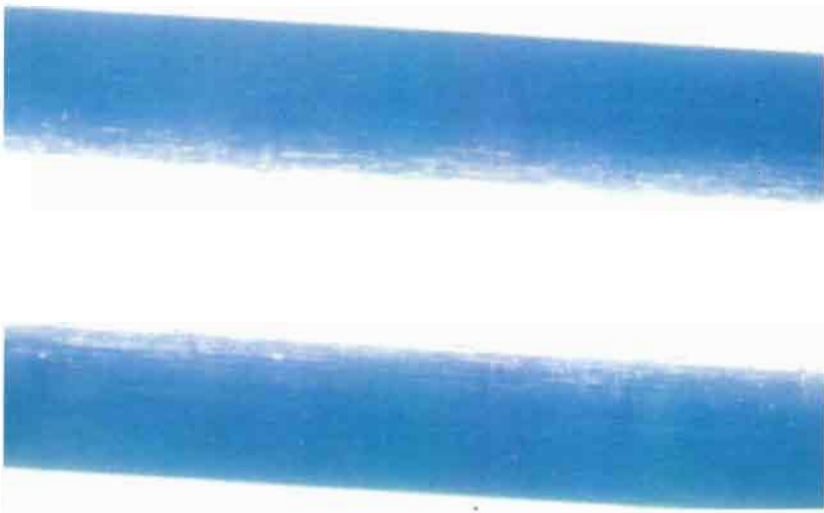


Fig. 12.—La imagen es una ampliación ($\times 70$). En ella se pueden observar las paredes de la pajueta (bandas negras) y tres embriones, dos de ellos muy juntos en centro izquierda.

Fig. 13.—Como resultado de la superovulación se pueden encontrar algunos lavados con un elevado número de embriones.



Fig. 14.—Mórula temprana en la que se puede apreciar la zona pelúcida y la asociación de sus células en dos grupos (filtro azul; 400 X).

Fig. 15.—En la foto se observan dos mórulas muy desarrolladas, pudiéndose ver incluso alguna de sus células (filtro azul; 400 X).

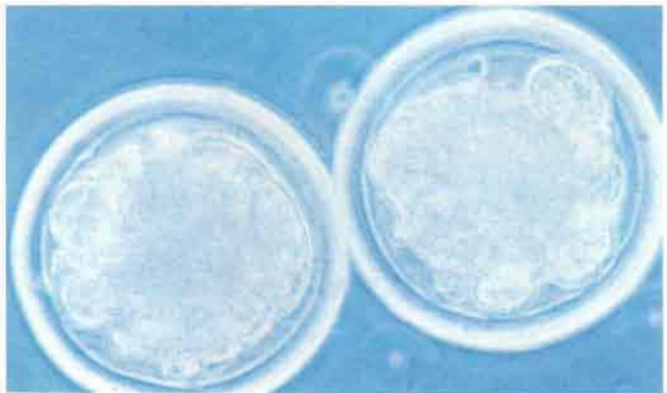




Fig. 16.—Mó-
rula encerrada
por zona pelú-
cida y zona pelú-
cida rota, donde
se han perdido
todas las célu-
las embriona-
rias (filtro azul;
400 X).

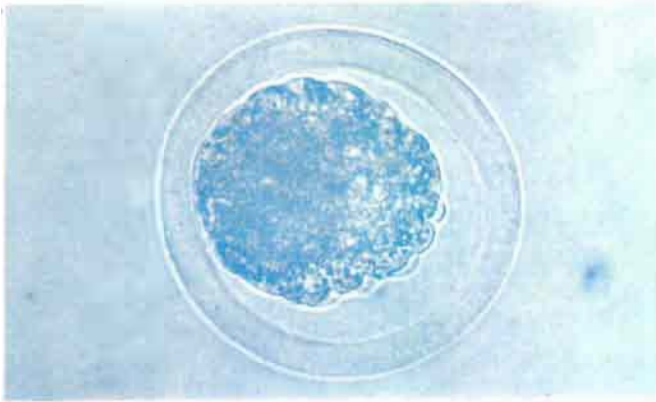
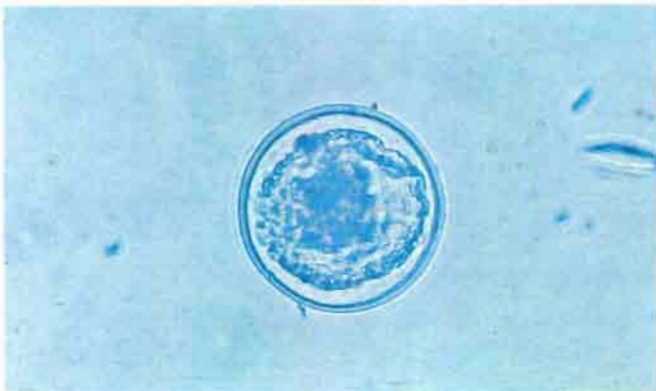


Fig. 17.—Móru-
la tardía, donde
se aprecia clara-
mente la zona
pelúcida y la su-
perficie de algu-
nas de sus célu-
las (400 X).

Fig. 18.—Em-
brión en el que
se puede apre-
ciar la zona pe-
lúcida y el botón
embrionario (en
el centro), zona
más oscura de-
bido a la alta
densidad de las
células embri-
onarias, también
llamadas trofo-
blastos (200 X).



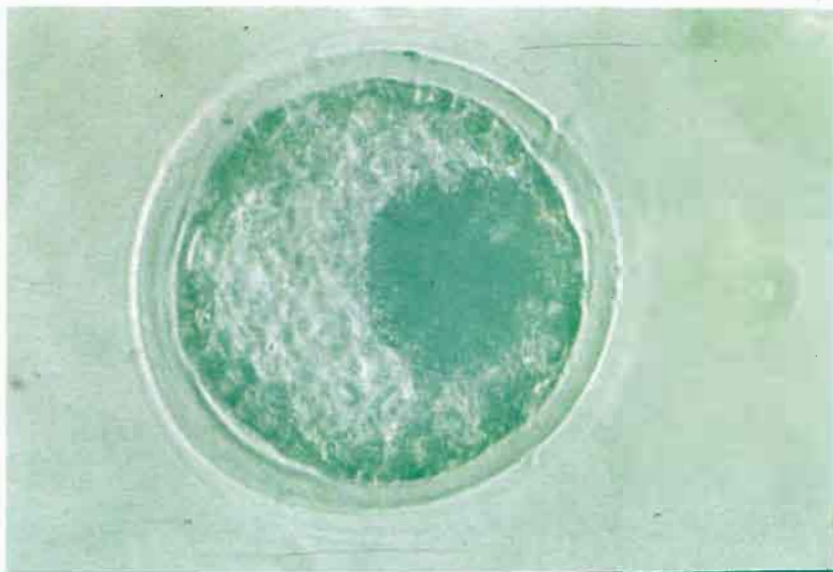


Fig. 19.—Blastocisto de 8 días, donde se puede apreciar claramente la zona pelúcida, el botón embrionario (en un lateral), la cavidad blastocélica y las células del trofoblasto (próximas a la zona pelúcida) (filtro verde; 400 X).

Cuando es localizado un embrión se traslada a una placa Petri pequeña que contiene un PBS con más suero bovino, y se mantiene a 37^o C, en espera de valorar su calidad.

Posteriormente se observan y valoran de cada embrión las siguientes características:

- Fase de desarrollo (edad del embrión).
- Si está entero o ha perdido alguna célula.
- Forma (la mejor es la esférica).
- Masa celular homogénea y uniformemente repartida.

2.5. Deposición o colocación de los embriones

Sincronización de celos

Normalmente será imprescindible que la vaca donante y las receptoras estén en una misma situación sexual (sincronizadas), con el fin de que el embrión encuentre el mismo ambiente uteri-



no que tenía cuando se recogió. Para sincronizar el celo en la vaca el método más utilizado consiste en destruir los cuerpos lúteos mediante prostaglandina $PGF2\alpha$ (natural u homólogo sintético), con ello salen los animales en celo unas sesenta y ocho horas después del tratamiento.

Se recomienda una diferencia de situación fisiológica donante/receptora no mayor de veinticuatro horas. Por ello, si no se conservan los embriones, una vez se diagnostica la presencia de un cuerpo lúteo en la/s vaca/s receptora/s se inyecta la prostaglandina, doce horas antes de hacerlo en la vaca donante, ya que el celo aparece antes en esta última por estar bajo los efectos de la superovulación.

Método y lugar

Para la deposición, una vez estudiado el embrión, se almacena en una pajuela de polivinilo de $0,25\text{ mm}^3$, situándose en el centro de la misma con PBS y aislado por dos burbujas de aire de los otros líquidos que también se almacenan en la misma. Por último, la pajuela se cierra en ambos extremos.

Para la deposición se emplea un catéter metálico, similar al usado en inseminación artificial. Una vez montado el catéter, es aconsejable introducirlo en una bolsa de plástico al objeto de evitar que la sonda se contamine en la vagina y puedan pasar gérmenes al útero; esta bolsa se romperá al presionar con el catéter. El método seguido consiste en localizar, por palpación rectal, el ovario que presenta el cuerpo lúteo funcional y mediante el catéter pasar el cervix y depositar el embrión en el espacio uterino.

El sitio en que se deposita el embrión influye de manera total en su implantación; así, de diversos trabajos en los que con condiciones similares se estudiaba esta influencia, se ha concluido que los porcentajes más bajos de éxito se tienen con la deposición en el cuerno uterino que corresponde al ovario sin cuerpo lúteo, seguido de los obtenidos con deposiciones en el cuerpo del útero que mejoran, aunque poco, los resultados. Por último, los valores más altos se consiguen al colocar el embrión en el tercio



Fig. 20.—La deposición se efectúa presionando el émbolo con el dedo pulgar, mientras se sujeta el catéter por su base.

posterior del cuerno uterino correspondiente al ovario que presenta el cuerpo lúteo.

También se recomienda para mejorar la eficacia de la deposición efectuar anestesia epidural caudal baja para relajar la musculatura uterina.

Una vez realizada la deposición lo más frecuente es efectuar un diagnóstico de gestación, por reconocimiento de los anejos fetales, mediante palpación rectal pasados treinta y cinco días. Se puede avanzar un diagnóstico, de manera poco precisa, al constatar la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario a los quince días de la deposición.

2.6. Resultados

El éxito de la T. E. utilizando embriones no conservados oscila, según diversos autores, entre el 40 y el 70 por 100 de viabili-



dad (fertilidad). Los principales factores de variación que determinan la viabilidad embrionaria son los siguientes:

- **Razas** de la vaca donante y de la receptora.
- **Número de tratamiento** superovulatorio sobre el mismo animal donante.

- **Momento de la recogida.** El mejor es a los 5/7 días de la inseminación artificial.

- **Calidad del embrión.** En ella también influye el método superovulatorio seguido.

- **Edad del embrión.** No es determinante.

- **Método de inducción del celo** en la vaca receptora.

- **Sincronización donante-receptora.** En líneas generales se puede decir que se tiene un mayor éxito cuanto mayor sea la sincronía del ciclo sexual entre ambas, no habiéndose encontrado efectos perjudiciales si la donante entra en celo antes que la receptora (en ± 12 horas). Por otro lado, los embriones cuanto más edad tienen menos se ven afectados por ligeras variaciones en la sincronización; así la fertilidad de los embriones muy tempranos (mórulas) se ve muy perjudicada tanto por adelantos como por retrasos de la vaca receptora, con tres días de desfase la pérdida en fertilidad puede superar el 50 por 100.

- **Lugar de deposición.** Influyendo como indicamos anteriormente.

- **Conservación de los embriones.** El almacenaje influye negativamente, tal y como se refiere a continuación.

De los trabajos de investigación se concluye que una serie de factores, que podrían en principio parecer importantes, no tienen ninguna influencia sobre los resultados de la técnica:

- **Número de lactación** de la donante.

- **Día del ciclo** en que se inicia el tratamiento superovulatorio, estando entre los límites indicados.

- **Intensidad de la respuesta ovárica.**

- **Duración del estudio** del embrión.

- **Número de veces** que una vaca haya sido receptora.

- **Calidad y tamaño** del cuerpo lúteo de la receptora.

- **Cuerno donde se depone el embrión,** izquierdo o dere-

cho, siempre y cuando sea el del ovario donde aparece el cuerpo lúteo.

3. CONSERVACION DE EMBRIONES

El almacenamiento de los embriones persigue mantenerlos sin mortalidad ni perjuicio de sus células, desde la recogida hasta la deposición. Como es lógico, con la técnicas de conservación se pretende alejar ambos procesos lo más posible.

En el líquido de lavado los embriones bovinos, a temperatura ambiente (entre 18 y 20° C), se pueden mantener poco más de cinco horas. Entre 0 y 4° C se pueden conservar de veinticuatro a cuarenta y ocho horas, con unos niveles de fertilidad sólo ligeramente peores que sin almacenar; a esta temperatura existen referencias que alcanzan aún los cuatro-cinco días de conservación en unas condiciones aceptables.

En resumen, la calidad de la conservación se mide en días y en porcentajes de viabilidad obtenidos, ambas variables dependen de la temperatura.

La conservación por congelación dentro de tanques de nitrógeno líquido (—196° C), supuso un paso muy importante en la generalización de la transferencia de los embriones bovinos. Las ventajas más señaladas de la congelación son las siguientes:

- 1.^a Conservación de material genético por largos períodos de tiempo.
- 2.^a Metodología relativamente sencilla y económica.
- 3.^a Facilita el transporte y el comercio nacional e internacional.

A pesar de estas ventajas, la congelación tiene todavía hoy la importante desventaja de reducir sensiblemente los porcentajes de fertilidad conseguidos, hasta un 50 por 100 si lo comparamos con embriones frescos.

3.1. Método de congelación convencional

Para que en la congelación se mantengan intactas las células del embrión es necesario conseguir que los cristales de hielo in-



tracelular que se forman no sean demasiado grandes y puedan destruir las paredes celulares. Asimismo se debe evitar que la pérdida de agua celular, que implica la congelación, no sea demasiado brusca.

Para poder controlar estos factores, en la congelación se usan sustancias (crioprotectores) que protegen de los cambios químicos y de la deshidratación a las células embrionarias. También hay que cuidar la velocidad y ritmo de refrigeración.

Los crioprotectores son sustancias muy ligeras para que puedan atravesar la pared celular, generalmente son alcoholes, siendo el más utilizado el glicerol. Para que se introduzca el crioprotector en las células del embrión, se le debe someter a baños con concentraciones crecientes del crioprotector.

Una vez con el crioprotector, se introduce el embrión en la pajueta que se cierra y comienza a enfriar hasta los -7° C. A esta temperatura se hace el «seeding» o inducción automática a la cristalización; éste consiste en someter a la pajueta a un enfriamiento brusco para eliminar el calentamiento debido a la cristalización del líquido donde se encuentra el embrión. Después se debe enfriar lentamente, a $0,3-0,6^{\circ}$ C/minuto hasta los $-35-50^{\circ}$ C, momento en el que se sumerge la pajueta directamente en el nitrógeno líquido. Aunque éste es el método normalmente seguido para la refrigeración, existen múltiples variantes, dependiendo de los criterios del equipo de trabajo.

Para utilizar el embrión congelado se debe cuidar tanto la variación de temperatura como la necesidad de eliminar el crioprotector. Normalmente se introduce la pajueta en un baño de agua entre 20 y 37° C, pudiendo eliminar el crioprotector, una vez sacado el embrión de la pajueta, de las dos maneras siguientes:

— Poner el embrión en baños con concentraciones decrecientes de crioprotector, dejándolo en cada uno alrededor de cinco minutos.

— Poner el embrión durante unos quince minutos en una disolución que contenga un azúcar (sucrosa $0,1-1$ Molar), ya que el azúcar entra en las células sustituyendo al crioprotector.

Muchos estudios sobre descongelación han ido dirigidos a poder transferir el embrión desde la misma pajueta en la que se almacena. Esquemáticamente se puede decir que estos métodos se basan en introducir una solución con azúcar en los extremos de la pajueta, separada del PBS por aire. La pajueta se prepara así antes de congelar para que al descongelar, si se agita bien la pajueta, se mezclen ambas soluciones. Esto permite transferir el embrión directamente desde la pajueta de almacenamiento, aunque con el inconveniente de una baja fertilidad. Los niveles de supervivencia postcongelación se estiman en torno al 55 por 100 para la congelación con embriones de ocho días.

Como curiosidad recordaremos otra forma de conservación, llamada vitrificación, que nació como una gran expectativa de simplificar el método de congelación. Se fundamenta en conseguir que la congelación del líquido exterior e interior de las células sea simultánea; para ello es necesario emplear elevadas con-



Fig. 21.—Para el transporte de las pajuelas, con embriones congelados, se emplean contenedores similares a los usados en inseminación artificial.



centraciones de agentes crioprotectores introduciendo después directamente la pajueta en el nitrógeno líquido (congelación rápida). Con la vitrificación se reduce tanto la fertilidad, sobre todo con embriones de siete-ocho días, que no se ha generalizado su empleo.

4. CONCLUSIONES

Hay que destacar el gran avance que supone la transferencia embrionaria en el control de la reproducción animal, ya que el poder manipular los gametos femeninos y el embrión tiene una gran trascendencia científica.

Para analizar su aplicación práctica en el caso de la especie bovina se debe considerar que, en el nivel de desarrollo actual de la técnica, son sólo cinco los embriones utilizables por cada recogida, de ellos no se obtendrán más de dos o tres nacimientos. Por lo que, dado el alto costo del proceso, el precio de ternero nacido sigue siendo hoy en día muy elevado, permitiendo rentabilidad en casos especiales como los de las vacas de alto valor genético.

Para que la técnica pueda llegar a ser económicamente rentable y se generalice es necesario mejorar:

- El número de embriones útiles recogidos en cada lavado, para abaratar su precio.
- El porcentaje de éxitos en la deposición.
- La aplicación de mejoras en la producción, derivadas de las técnicas genéticas que necesitan de la T. E. (determinación del sexo, inyección de DNA, etc.).

Tampoco se debe olvidar que con estos índices y complejidad de la técnica, mientras sea obligado que una vaca geste los embriones, la ventaja de transferir los de otra vaca sólo se derivará de su calidad genética mejorante. Esta condición presenta una gran diferencia ente la T. E. y la otra técnica de transmisión de gametos (la inseminación artificial), ya que con la I. A. hay ven-

tajas en el manejo del rebaño sin los machos (ahorro de inversión, alimentos, sanidad), que no tienen parangón en la T. E.

5. BIBLIOGRAFIA

Las referencias no periódicas que nos parecen de mayor interés son las siguientes:

BRUYAS, J. F., y colaboradores (1989). **Actualidades y perspectivas de futuro del trasplante embrionario en el ganado bovino**. Medicina Veterinaria, 6 (4), 233-252.

CURTIS, J. L. (1991). **Cattle embryo transfer procedure**. Ed. Academic Press, pp. 131.

DE LA FUENTE, J. (1989). **Frisona Española**.

PEREZ, F. (1985). **Reproducción, inseminación artificial y trasplante de embriones**. Ed. Científico Médica, pp. 900.

THIBIER, M. (1989). **Transferencia de embriones en bovinos**. III Jornadas Producción Animal, pp. 197-210.

La revista norteamericana «Theriogenology» presenta mucha información sobre los últimos avances científicos en la técnica, ya que es editada por la International Embryo Transfer Society.



MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACION

INSTITUTO NACIONAL DE REFORMA Y DESARROLLO AGRARIO

DIRECCION GENERAL DE INFRAESTRUCTURAS Y COOPERACION

Corazón de María, 8 - 28002-Madrid