

CAPÍTULO XXIV

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN GANADO BOVINO

- I. INTRODUCCIÓN
- II. SELECCIÓN DE DONANTES
 - 1. Criterios genéticos de selección
 - 2. Criterios no genéticos de selección
- III. SUPEROVULACIÓN DE DONANTES
- IV. MANIPULACIÓN DE EMBRIONES
 - 1. Obtención de embriones
 - 2. Evaluación de embriones
 - 3. Conservación de embriones
- V. SELECCIÓN DE RECEPTORAS
 - 1. Características de las receptoras
 - 2. Sincronización de receptoras
 - 3. Transferencia
- VI. TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES
- VII. LITERATURA CITADA

I. INTRODUCCIÓN

La manipulación de los primeros estadios del desarrollo de los mamíferos se inició hace ahora 100 años con los trabajos de W. Heape [25], quién se propuso estudiar en la coneja la importancia del ambiente materno y su influencia sobre el desarrollo de los embriones transferidos. A lo largo de estos años los objetivos y finalidades de búsqueda han sido muy variados, desde los estudios puntuales para el esclarecimiento de los fenómenos fisiológicos, a la multiplicación y conservación de especies en peligro de extinción, el transporte, conservación e incremento de las producciones animales y como herramienta de primer orden en la conservación de especies en peligro de extinción. Así mismo, ha tenido una función relevante al servir como modelo biológico para su extrapolación a la reproducción asistida humana.

En las últimas décadas es la vertiente productiva la que ha proporcionado un mayor impulso y desarrollo de las técnicas de manipulación y es sobre todo en el ganado vacuno donde más se han desarrollado y difundido. Gracias a la existencia de programas de mejora genética y a la difusión de la inseminación artificial, se pueden utilizar machos de élite sobre hembras excepcionales para producir descendientes de alta calidad, que superen las producciones de sus antecesores. En la actualidad está tomando gran desarrollo su utilización en la conservación de la Biodiversidad Animal.

Desde el punto de vista metodológico la técnica de la transferencia de embriones (TE) es sencilla en su concepto pero compleja en cuanto a su realización, debido principalmente al gran número de factores que inciden sobre ella y a la necesidad de una serie de pasos precisos y consecutivos, de cada uno de los cuales dependerá el éxito o fracaso de la técnica.

Debido a los altos costes que implica la realización de la TE, resulta evidente que uno de los factores mas importantes a tener en cuenta es la elección de las hembras donantes, por lo que se ha de ser lo más preciso y estricto posible en su selección. Los mayores riesgos han de asumirse en el apartado de la superovulación ya que entre 20-25% de los animales no responde a los tratamientos estimulatorios y aquellos que lo hacen presentan una gran variabilidad en las respuestas. La mayor limitante en la TE es pues la variabilidad en la respuesta superovulatoria de las hembras donantes, que entre otros factores viene condicionada por el estado general, historial clínico del animal, el momento de la superovulación, la dosis y tipo de hormona estimulante utilizada, el número de superovulaciones consecutivas realizadas y una componente genética indeterminada.

La evaluación de los embriones después de su recuperación es el elemento fundamental para su posterior manipulación (congelación y transferencia); por el momento y en las condiciones de campo en las que habitualmente se trabaja, el criterio de valoración morfológico es el más utilizado, obteniéndose resultados muy fiables. Los diferentes métodos de sincronización de las receptoras, una estricta detección de celos y la exploración rectal pre-transferencia son los factores determinantes en los resultados de fertilidad. Del buen entrenamiento y saber hacer del técnico depende que tanto la manipulación *in vitro* de los embriones como

su transferencia a la receptora, sean seguros (en términos sanitarios) y eficaces (en cuanto a tasas de gestación).

II. SELECCIÓN DE DONANTES

Aún no existe la vaca donante que sirva para cumplimentar todas las exigencias requeridas por un ganadero o bien para adaptarse a la situación del mercado en cada momento, por lo que hay que tener en cuenta unos criterios generales que se puedan utilizar para incrementar el nivel genético medio del rebaño y hacer de la TE una aventura rentable.

1. Criterios genéticos de selección

Antes de superovular una vaca debemos conocer su capacidad de transmisión. En la actualidad se están superovulando muchas vacas que no cumplen con las cualidades genéticas requeridas para la transmisión de caracteres rentables a sus descendientes. Así muchas vacas, bajo la vista de su propietario, parecen de mayor valor genético que el que en realidad tienen [4].

Hasta hace relativamente poco tiempo los criterios de selección estaban basados fundamentalmente en el “pedigrí”, la procedencia de las vacas de familias denominadas “profundas” y sus caracteres fenotípicos, tanto de producción como de conformación. En el caso de la producción de leche se hablaba de vacas con tres o cuatro generaciones de madres “Excelentes” o “Muy Buenas”, con una producción de 10.000 litros o mas [4, 47]. Efectivamente estos criterios han resultado de gran valor hasta la aparición de los índices genéticos de vaca.

Índice de vaca. Las ideas apuntadas anteriormente hacían pensar que la vaca más productora del rebaño era la mejor candidata como donante de embriones, esperando que tuviese el mayor índice genético para leche. Sin embargo, a pesar de existir una gran relación entre ambas (producción e índice) no tiene porqué ser así. La aparición y puesta a punto de la metodología BLUP-Modelo Animal nos permite obtener unos índices genéticos de vaca muy fiables y de gran valor para acometer, con criterios objetivos, la selección de nuestra vaca donante. Para obtener el índice genético de una vaca se incorporan los valores de su propia lactación, la de todos sus familiares y la de todas sus compañeras de rebaño, siendo todas las conexiones familiares utilizadas para estos cálculos [3].

EL Índice Genético de una vaca nos indica lo que la vaca transmite a su descendencia, es decir, nos habla de la capacidad de producción que tendrán sus descendientes. Además debemos considerar que cada lactación de una vaca posee unas circunstancias de producción distintas (manejo y alimentación, incidencia de enfermedades, número de lactación, intervalo entre partos, edad y mes del parto), existiendo algunos factores que influyen en todas las lactaciones del animal pero que no se transmiten a la descendencia (mastitis, problemas de pezuñas, etc.). Todas estas circunstancias ambientales hacen que las producciones observadas de un animal no sean un criterio preciso para decidir qué animales son los candidatos más idóneos para ser sometidos a superovulación [1].

Estos índices están referidos tanto a caracteres productivos (Leche, Grasa, % de Grasa, Proteína, y % de Proteína) como a caracteres morfológicos (Calificación Final, Apariencia General, Carácter Lechero, Capacidad Corporal, Grupa, Miembros y Aplomos, Sistema Mamario, Ubre Anterior, Ubre Posterior y Tamaño). Por todo ello se ha creado el Índice Combinado de Producción y Tipo (ICO) que unifica a los principales factores que afectan a la rentabilidad : producción y vida productiva. Los índices genéticos de vaca están disponibles en el Estado Español dos veces al año coincidiendo con las evaluaciones genéticas realizadas.

Normalmente se acostumbra a formar un grupo de donantes de élite que contenga aproximadamente al 1-5% de los animales presentes en el rebaño o agrupación de ganaderos, para asegurar un progreso genético adecuado. Cuanto mayor sea la variabilidad genética de la población de animales, más interesante resultará la utilización de la TE y por añadidura se conseguirá una mayor optimización del valor del semen a utilizar.

2. Criterios no genéticos de selección

Las donantes deben ser consideradas tanto de forma individual o como integrantes de un rebaño y por lo tanto condicionadas por el manejo que el ganadero realiza en su estancia. A la hora de decidir cuando superovular, deberemos estudiar y valorar aquellos factores ligados tanto al individuo como al rebaño.

Criterios reproductivos. Una vez elegidas las hembras genéticamente superiores se ha de realizar una nueva selección bajo el punto de vista reproductivo, para lo cual se han de tener en cuenta diferentes extremos. Entre los mas importantes se encuentran:

Ausencia de antecedentes patológicos anteriores como abortos, retenciones placentarias y quistes, ya que reducen la probabilidad de una producción óptima de embriones [19, 21]. Es deseable que los animales propuestos para la superovulación no presenten una media superior a las 3 inseminaciones por gestación, si bien, en el caso de animales de gran valor, pueden ser utilizados como donantes; sin embargo, aunque la respuesta esperada puede reducirse al 50% de los animales y del número de embriones, estos serán igual de fértiles que los de los animales no “repetidores” [9].

Ciclicidad anterior a la superovulación. Con el fin de tener la seguridad de que se ha restablecido la función ovárica normal, se deberán detectar 2-3 ciclos sexuales completos y regulares después del parto. Ello resulta en un intervalo parto superovulación mínimo de 60-90 días, siendo el óptimo de 90-120 días [19].

Hay que diagnosticar el estado ginecológico actual mediante la exploración rectal, determinando por palpación la presencia de un buen cuerpo lúteo discernible de buena conformación y el tracto genital sin apreciaciones patológicas. Es conveniente realizar el tratamiento urgente de infecciones y enfermedades metabólicas en el postparto, que pueden tener un efecto residual sobre la respuesta superovulatoria meses después.

En cuanto a los machos a utilizar, su elección ha de realizarse entre aquellos de alta y probada fertilidad, mejorantes de los defectos de la hembra donante y

tratando de evitar la utilización de animales que produzcan crías de gran tamaño, en el caso de utilizar novillas como receptoras.

a. Factores ligados al individuo

Edad: En el ganado Holstein hasta los 7-8 años, la respuesta a la superovulación entra dentro de los parámetros normales, pero a partir de esta edad se inicia un descenso tanto en el porcentaje de vacas que responden al tratamiento, como en el número y porcentaje de embriones viables obtenidos. La edad óptima se sitúa entre los 2 y 5 años. Cuando las donantes son novillas, la superovulación se puede realizar a partir de los 14-15 meses, siempre que los animales presenten un buen desarrollo y condición corporal.

Estado fisiológico: El estado fisiológico del animal (vacas en producción o secas), conlleva un manejo distinto en el rebaño, y una problemática diferente que tendremos que valorar para decidir el cuando y el como de la superovulación.

En las vacas en producción, el intervalo parto-superovulación mínimo dependerá inicialmente del estado reproductivo de la donante, por lo que podremos situarlo alrededor del día 60 post-parto, momento en el que el aparato reproductor debe estar en perfectas condiciones, además de haberse observado mas de un celo a intervalos regulares. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en los primeros meses después del parto la vaca se encuentra en una situación de balance energético negativo. En estas circunstancias los intentos de superovulación conducirán normalmente a la obtención de malos resultados, por lo que es necesario esperar a que los animales aumenten su capacidad de ingestión, recuperen peso y bajen el nivel de producción. Por lo anteriormente expuesto podemos situar el momento óptimo para la superovulación entre los 90 y 120 días, teniendo en cuenta que el ganadero desea generalmente dejar lo antes posible la vaca gestante, para no alargar excesivamente el intervalo entre partos.

Cuando se trata de vacas secas, se sabe que en el período seco el principal problema es la falta de producción lo que puede llevar a un engrasamiento muchas veces excesivo, disminuyendo la efectividad del tratamiento y la calidad de los embriones obtenidos.

b. Factores ligados al rebaño

Alimentación: La alimentación de la donante, tanto en el período seco como en el postparto, va a ejercer una gran influencia en el intervalo parto superovulación, en el porcentaje de vacas que responden al tratamiento y en la cantidad y calidad de los embriones obtenidos.

La donante debe alcanzar el nivel óptimo de condición corporal en el último tercio de la lactación, para mantener este estado durante el período seco y llegar al parto en buen estado corporal, pero nunca gordas ni flacas, con un nivel óptimo de puntuación de 3 en la escala de 1 a 5. La alimentación en el post-parto debe ser equilibrada y ajustada a sus necesidades fisiológicas y nivel de producción. El control de la alimentación de las donantes debe iniciarse mucho antes del inicio de la superovulación, ya que los errores cometidos incluso siete u ocho meses antes de la superovulación ejercerán una acción negativa sobre la respuesta superovulatoria.

Estrés: Cualquier factor estresante influirá negativamente en la superovulación. Básicamente hay que evitar los cambios bruscos en el manejo, no realizar vacunaciones ni tratamientos preventivos de ningún tipo, así como evitar las superovulaciones en los meses de mas calor.

Ganadero: El ganadero es un factor de vital importancia, puesto que de él depende todo el manejo del rebaño; de su grado de competencia y confianza con el veterinario dependerá en gran medida el éxito de la TE. La detección de celos deberá realizarla de forma eficiente ya que de los celos depende el inicio de la superovulación así como la inseminación de la donante y la posterior implantación de los embriones en las receptoras. Una deficiente detección de celos puede ser causante de la ausencia de embriones viables el día de la colecta, así como de la carencia de gestaciones después de la transferencia.

Hay que tener en cuenta que la preselección reproductiva intensa de los animales destinados a donar embriones es muy importante, pues disminuye la incidencia del número de hembras que no responden a los tratamientos superovulatorios y mejoran la respuesta media del número de embriones viables o transferibles de un programa de TE.

III. SUPEROVULACIÓN DE DONANTES

El fundamento de la TE radica en la sobreestimulación de los ovarios de la hembra donante para producir un elevado numero de ovulaciones y así conseguir el mayor numero de embriones fecundados y desarrollados en un solo ciclo sexual. Para alcanzar este fin es necesaria la utilización de hormonas gonadotropas exógenas. Entre ellas las mas utilizadas son la gonadotropina del suero de yegua gestante (PMSG), la gonadotropina menopáusica humana (HMG) y la hormona foliculo estimulante (FSH), de la cual existen numerosos productos en el mercado que proceden de diversos orígenes: Pluset, Folltropin, Ovagen y Stimufol.

La variabilidad individual en la respuesta superovulatoria a las gonadotropinas exógenas es el factor limitante mas importante que afecta a los resultados de la superovulación, de tal manera que los rangos de respuesta varían de 0 a 50 embriones, mientras que las tasas de viabilidad se sitúan entre el 0 y 100% de los embriones recogidos de una donante, independientemente de la hormona utilizada o de cualquier otra variable. Así pues el objetivo principal de los tratamientos de superovulación es producir un gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez, sin embargo la respuesta a estos tratamientos es muy variable y difícil de predecir [24, 28, 31].

Se ha asociado la variabilidad en la respuesta ovárica con causas relacionadas con los tratamientos utilizados para inducir superovulación; las preparaciones hormonales [35], los lotes de gonadotropinas [8], la duración del tratamiento [17], el momento del tratamiento con relación al ciclo estral [30], la dosis total de gonadotropinas y el uso de hormonas adicionales [39]. También hay otros factores importantes que son inherentes al animal y a su ambiente, la historia reproductiva

[24], la edad [28], la estación del año [33], la raza [5] y el estado ovárico en el momento del tratamiento [30, 37].

La edad óptima para la superovulación se sitúa en los 3-4 partos, descendiendo la respuesta embrionaria tanto en cantidad como en calidad a medida que aumenta la edad, encontrándose el punto de inflexión en los diez años, después de los cuales las respuestas comienzan a descender progresivamente a gran velocidad [26, 28].

Las gonadotropinas actúan sobre el ovario ejerciendo su influencia en el crecimiento folicular, modificando la multiplicación celular, el crecimiento del ovocito y el desarrollo del antrum: de esa forma, aumentan la salida de folículos primordiales del "pool" folicular y se reduce el número de folículos atrésicos [32]. Se ha puesto de manifiesto que existe un efecto entre la dosis total de hormona gonadotrópica exógena y la producción de embriones. Saumande y Chupin [41] inyectando altas dosis de PMSG encontraron un efecto inhibitorio de la respuesta, mientras que por otro lado, se ha reportado una disminución en el número de embriones viables, aunque no en el total de embriones obtenidos, el cual no variaba entre dosis de 15 y 45 mg de FSH, sin embargo, decrecía significativamente a una dosis de 60 mg [39].

El uso de la ultrasonografía ha permitido evidenciar definitivamente que existen ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral del bovino [18]. Se ha demostrado que una onda de desarrollo folicular está constituida por el crecimiento de varios folículos antrales (4-5 mm. de diámetro) seguido por la selección de un folículo dominante y la regresión del resto de los folículos subordinados. En ausencia de regresión luteal el folículo dominante regresiona (se atresia) y da lugar a una nueva onda de crecimiento folicular. La identificación de los folículos individuales por medio del examen ultrasonográfico diario ha demostrado que la mayoría de las vacas exhiben dos o tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral.

Hacia la mitad de la onda folicular ovárica el folículo dominante, actuando local o sistémicamente, induce atresia de los restantes folículos en desarrollo. Por medio del examen ultrasonográfico se puede decidir el momento propicio para la iniciación del tratamiento en cada animal. En este sentido, se ha demostrado que la presencia de un folículo dominante en el momento del inicio del tratamiento disminuía la respuesta superovulatoria en un 40 a 50% [20], apreciando también una alta correlación entre número de folículos menores de 5 mm de diámetro y la respuesta superovulatoria. En términos generales, estos datos sugieren que debería esperarse una respuesta superovulatoria baja si los tratamientos son iniciados en presencia de un folículo dominante activo. Por el contrario, la presencia de folículos (3-6mm de diámetro) en la fase de crecimiento estaría asociada con una buena respuesta. En condiciones de campo, es difícil determinar, con un solo examen ultrasonográfico, si un folículo grande es funcionalmente dominante y si los folículos pequeños están en la fase de crecimiento activo o en la de atresia. No obstante, la presencia de más de seis o siete folículos de 3-6mm de diámetro junto a un folículo grande, 8 a 10 días después de la ovulación, da evidencias de que está comenzando una nueva onda folicular.

Los tratamientos superovulatorios se inician generalmente entre los días 8 a 12 del ciclo estral (celo = día 0). Este momento de iniciación del tratamiento se basó originalmente en la teoría de que en este momento comenzaba a madurar una onda de folículos. Lindsell [30] demostró que podía alcanzarse una respuesta superovulatoria mayor si los tratamientos estimulatorios se iniciaban el día 9 del ciclo, comparada a la que se obtenía comenzando en los días 3, 6 ó 12. Estas observaciones han sido corroboradas por recientes evidencias ultrasonográficas [18] que muestran que la segunda onda folicular comienza, en promedio, el día 9.5 del ciclo en las vacas de tres ondas y el día 10.5 del ciclo, en las de dos ondas.

Se ha demostrado que tanto la tasa ovulatoria como el número de embriones viables producidos son caracteres relativamente inherentes a cada vaca donante. Los animales que tienen una respuesta baja en un tratamiento, probablemente continuarán en la misma forma en los tratamientos consecuentes y los animales que responden bien inicialmente continuarán haciéndolo en esta forma [36, 37].

Generalmente se acepta que la estimulación con FSH resulta superior a la realizada con PMSG [8, 37], a pesar de la variación en la relación FSH:LH de los preparados de FSH, que se ha demostrado afecta a la producción embrionaria [5, 14]. Para evitar el efecto pernicioso originado por la larga vida media de la PMSG se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-PMSG [10-12] con lo que se consiguieron respuesta similares a las obtenidas con FSH. Una mención aparte merecen las experiencias Danesas [19] en las que FSH, PMSG y anti-PMSG ofrecen un idéntico número de embriones viables.

El incremento del número de embriones viables obtenidos de un mismo animal puede conseguirse mediante la realización de superovulaciones consecutivas. Dependiendo del intervalo de tiempo transcurrido entre ellas y de la variabilidad individual, se puede mantener la respuesta total de embriones, aunque descienda ligeramente el número de embriones viables, lo cual hace descender significativamente la tasa de viabilidad [10, 24]. En la practica totalidad de los programas de superovulación se realizan dos inseminaciones artificiales sobre la hembra superovulada, sin embargo se ha puesto de manifiesto [13] que una sola inseminación produce el mismo número de embriones viables.

IV. MANIPULACIÓN DE EMBRIONES

1. Obtención de embriones

Entre el sexto y octavo día (día 0 = día del celo) se procede a la obtención de los embriones producidos, ya que antes de este momento algunos embriones pueden permanecer aún en los oviductos [38]. Actualmente se utilizan catéteres de obtención transcervical (Foley, Rusch), provistos de un balón insuflable en su extremo que permite crear un compartimiento estanco en la parte distal del cuerno uterino y proceder al arrastre de los embriones allí localizados. El medio de arrastre más utilizado es una solución tampón fosfato-salina (PBS: ajustado a pH=7 y POsm. 280 mOsm/K), suplementado con antibióticos y proteínas.

2. Evaluación de embriones

Después de recuperado el medio de lavado los embriones deben ser aislados del volumen total utilizando diversos métodos de filtración y drenaje, para poder realizar su evaluación morfológica y determinar su utilización posterior. Según los criterios descritos en 1990 en el Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones [27], los embriones han de ser catalogados de acuerdo a su estadio de desarrollo, nombrándoles del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocisto eclosionado), y según su calidad: excelente (1), bueno (2), regular (3) y degenerado (4).

Una vez que se ha realizado el diagnóstico morfológico y se han determinado aquellos embriones capaces de proseguir su desarrollo, se puede proceder a su manipulación para posteriormente ser transferidos a hembras receptoras. En la actualidad, en condiciones de campo, se puede llevar a cabo la conservación, congelación y partición de los embriones. Cuando se dispone de un laboratorio adecuado se puede llegar incluso a determinar el sexo.

3. Conservación de embriones

Una vez obtenidos los embriones, podrán ser transferidos a las hembras receptoras, debidamente preparadas con antelación, tan pronto como sea posible. No obstante, en el caso de necesidad los embriones pueden ser conservados a bajas temperaturas (0° - 4°C), sin que se aprecie una pérdida de viabilidad en las primeras 24 horas, decreciendo en un 50% a las 48 h. y perdiéndose totalmente a las 120 h. [29]. Por lo tanto y sin duda alguna, la congelación es la metodología de elección para la conservación y transporte a largas distancias. La congelación de embriones permite el mantenimiento de la viabilidad embrionaria por largos períodos de tiempo y en consecuencia, contribuye a aumentar el rendimiento de un programa de superovulación, al no perder embriones cuando no se dispone del número suficiente de receptoras, tanto en cuanto a su cantidad como a su calidad. Es importante resaltar el hecho de que solo los embriones de excelente calidad y con el grado de desarrollo normal son los adecuados para ser sometidos al proceso de congelación, ya que otras categorías ofrecen unos porcentajes de gestación inferiores e incluso nulos [7, 16].

La congelación constituye un proceso físico-químico gobernado por el calor y el transporte de sustancias entre las células y su medio externo. Para controlar estos factores se han utilizado una serie de compuestos crioprotectores con características similares; generalmente se acepta que estos compuestos protegen a las células de los efectos dañinos de las altas concentraciones de solutos, a medida que avanza la congelación [34]. Inicialmente los crioprotectores se adicionaban y retiraban del embrión mediante su inclusión en soluciones sucesivas de concentración crecientes y decrecientes, en la actualidad este proceso se puede realizar en un solo paso, descongelando y transfiriendo los embriones de forma similar a como se realiza una inseminación artificial y con resultados de gestación semejantes [6]. La velocidad de enfriamiento en las que la contracción celular no es óptima permiten la formación de hielo intracelular, resultando altamente correlacionada la cantidad de hielo intracelular con el daño producido en las células embrionarias [15]. El descenso lento de la temperatura (0.3° - $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) permite realizar la in-

mersión en nitrógeno líquido (a -196°C) desde temperaturas comprendidas entre -30 a -40°C , posibilitando la descongelación rápida de los embriones (aproximadamente $500^{\circ}\text{C}/\text{min}$), de manera similar a la realizada con el semen [40].

V. SELECCIÓN DE RECEPTORAS

El diagnóstico más fiable de la viabilidad embrionaria es la gestación y el parto de la hembra receptora, además de ser el objetivo último de cualquier técnica artificial de reproducción. Existen una serie de factores que conciernen al tipo de técnicas empleadas para la transferencia y sincronización entre donantes y receptoras, al embrión y a la receptora, que son los que determinan el éxito o el fracaso del conjunto de la TE.

1. Características de las receptoras

Diversos factores han de ser tomados en cuenta a la hora de seleccionar animales para organizar un lote de futuras receptoras de embriones, entre otros los mas importantes a considerar son:

Edad: La utilización de novillas como receptoras frente a vacas ofrece superiores tasas de gestación (53% vs 71%), mayor facilidad de manejo por su uniformidad y menor coste [2]. Deben ser seleccionadas aquellas novillas que ciclen normalmente y hayan alcanzado un 45-55% de su peso adulto, con un buen desarrollo y condición corporal.

Nutrición: El aporte energético y una condición corporal adecuada (de 2 a 3) son los principales factores que condicionan el éxito en la consecución de la gestación. Las receptoras deben estar en un estado positivo de energía y la ración en todos sus componentes (proteína, energía, minerales, vitaminas, etc.) debe ser equilibrada. En caso contrario habrá que suplementar hasta satisfacer las necesidades de cada animal. Cualquier cambio deberá realizarse gradualmente, siendo recomendable mantener a las posibles receptoras con la misma dieta por lo menos desde 6 semanas antes de la transferencia y mantenerla hasta los dos meses de gestación.

Estrés: El estrés puede interferir en casi todos los aspectos de la reproducción, tales como el celo, la ovulación, el desarrollo embrionario y la gestación. En la receptora, muchas pueden ser las causas de estrés, como climáticas, nutricionales y en muchas ocasiones el trato recibido por el ganadero. En el manejo de las receptoras se ha de evitar en lo posible cualquier factor estresante, así; en el rebaño de receptoras se debe mantener su composición y tamaño para evitar todo conflicto y trastorno de la conducta estral que impida la identificación del animal en celo. Los locales habrán de disponer de condiciones apropiadas, instalaciones cómodas y elementos de sujeción seguros para su manejo. El acostumbamiento de los animales al manejo que recibirán el día de la transferencia favorecerá el incremento de las tasas de gestación.

2. Sincronización de receptoras

El embrión, al ser transferido, ha de encontrar un ambiente uterino lo más similar posible al que soportaba en el animal donante. El sistema utilizado normal-

mente para conseguir este propósito consiste en la sincronización de celos entre donante y receptora, tratando de hacer coincidir lo mejor posible el estadio de desarrollo embrionario con su correspondiente estado uterino, siendo el margen de desequilibrio aceptable de ± 1 día [42] para que no represente un efecto adverso.

Para la sincronización de celos de las receptoras existen actualmente en el mercado los análogos de prostaglandina $F_{2\alpha}$ y los progestágenos. Las receptoras a las cuales para su sincronización con la donante se les administró $PGF_{2\alpha}$ (con o sin progestágenos), presentaron tasas de gestación significativamente superiores a las que fueron utilizadas tras la observación de un celo natural [23].

3. Transferencia

Una vez que se ha detectado perfectamente el celo, siete días después se procederá a la implantación del embrión. La palpación de un cuerpo lúteo (CL) de buena calidad es el método habitual de evaluación de la aptitud de la receptora. Al realizar la exploración rectal de las receptoras se califican los cuerpos lúteos de 1 a 3 según su tamaño y configuración. Debido a las relaciones entre embrión y ovario, los porcentajes de fertilidad aumentan al depositar los embriones en el cuerno del ovario activo, ipsilateral, llegando a incrementar hasta en 50% el número de receptoras gestantes [42].

Un último factor a tener en cuenta en la transferencia a las receptoras es el factor humano, de tal manera que las tasas de fertilidad variaron del 20% al 67% según la habilidad de cada técnico [23]. Así pues, la experiencia del operador es fundamental no solo en la palpación, sino en la transferencia para evitar cualquier daño a la receptora y así conseguir el mayor número de gestaciones.

VI. TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES

Ante la posibilidad de introducir mediante la TE enfermedades en zonas o rebaños sanos, todos los agentes patógenos han de ser considerados, por lo que actualmente 50 agentes han sido o están siendo investigados [45]. La mayoría de ellos afectan a la especie bovina, aunque algunos son específicos de los pequeños rumiantes y del porcino.

El embrión no es un buen hospedador de gérmenes, ya que posee una triple protección del medio ambiente: el cuerpo maternal, la cavidad uterina y la zona pelúcida. No obstante, se encuentra sometido a una serie de riesgos de contaminación que pueden provenir de los gametos iniciales (aunque esta posibilidad nunca ha sido demostrada) y que pueden suceder desde la fertilización hasta la transferencia.

En el ambiente uterino los embriones se encuentran en el tracto genital femenino después de una fase estrogénica elevada que promueve la movilización de los mecanismos de defensa contra patógenos. Dado el reducido tamaño del embrión y su movilidad limitada se reducen las posibilidades de exposición a los agentes patógenos, no existiendo al inicio entre 6 y 9 días de gestación, ningún intercambio directo ni gaseoso ni metabólico entre el embrión y el ambiente uterino. Por último, la zona pelúcida, cuando está intacta, al ser una membrana no celular

actúa a manera de barrera física para bacterias y virus que no podrán penetrarla, aunque podrían acompañarle en la recogida y posterior transferencia.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para determinar la capacidad de los embriones para transmitir enfermedades. La mayoría se han realizado exponiendo “*in vitro*” a los embriones al patógeno u obteniendo los embriones de donantes infectadas, para posteriormente ser analizados “*in vitro*” o transferidos a receptoras sanas. Generalmente los embriones se han expuesto “*in vitro*” a concentraciones muy superiores a las que podrían verse expuestos “*in vivo*” en las condiciones mas extremas; de igual manera, se han obtenido embriones de donantes virémicas y clínicamente enfermas, lo cual no sería en absoluto frecuente en la práctica, de tal forma que si el agente patógeno no es transmitido en esas condiciones, resulta muy improbable que lo sea por medio de embriones procedentes de donantes seropositivas [22].

Todos los agentes patógenos estudiados en los bovinos serían eliminados después de diez baños consecutivos en medio estéril (a diluciones 1/100), según las recomendaciones de la IETS y de la Oficina Internacional de Epizootias (Anexo 5321 del código zosanitario). Se ha descrito, no obstante, la posibilidad de que puedan adherirse a la zona virus como el IBR y VSV [43], los cuales está demostrado que pueden ser desprendidos después de un tratamiento con tripsina al 0.25% [44]. Estos dos agentes (IBR y VSV) que persistieron después de la exposición “*in vitro*”, en ningún caso se replicaron en las células embrionarias, lo cual solo ocurrió al desproteger a los embriones de la zona pelúcida. La ausencia de embriones no infectados obtenidos de donantes positivas no es debida a la ausencia de patógenos en el tracto reproductivo, ya que muchos de ellos fueron aislados, en bajos niveles, de los medios de lavado [46].

La posibilidad de contaminación a partir de la obtención dependerá de la asepsia en los métodos y la esterilidad de los medios y materiales utilizados para manipular “*in vitro*” los embriones.

VII. LITERATURA CITADA

- [1] Barret J. 1992. Finding the sources of top genetics. *Holstein World*: 37: 18-27.
- [2] Broadbent PJ, Stewart M and Dolman DF. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35 (1): 125-139.
- [3] Burnside EB. 1992. Estrategias globales de selección en los bovinos de leche. *Frisona Española*. 62: 37-40.
- [4] Cassell B. 1990. Finding bull mothers isn't getting any easier. *Hoard's Dairyman*: 617: 12-16.
- [5] Chuoin D., Cognie I., Combarous R., Procureur R. and Saumende J. 1988. Effect of purified LH and FSH on ovulation in the cow and ewe. In: *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*. Eds.: J.F. Roche and D. O'Callaghan. Martinus Nijhoff Pub. pp.63-71.
- [6] De la Fuente J, Fuentes S, Ugarte C. 1995. Pregnancy rates of one-step thawed MOET embryos. XI AETE Meet. Hannover. p:154. Abstr.

- [7] De la Fuente J, Monge A, Cocero MJ, Barragan C. 1989a. Porcentajes de gestación obtenidos en ganado vacuno por transferencia de embriones congelados. ITEA 79: 213-215.
- [8] De la Fuente J., Cocero M.J., López Sebastián A. y Barragan C. 1988b. Efecto de la utilización de distintas gonadotropinas exógenas (FSH y PMSG) sobre la cantidad y calidad de los embriones producidos por la hembra vacuna. ITEA 79: 3-11.
- [9] De la Fuente J., Monge A., Cocero M.J. y Barragan C. 1988a. Evaluación de la mortalidad embrionaria de vacas repetidoras de celos, a través de su producción embrionaria. Investigación Agraria. Prod. y San. Anim., 3: 183-193.
- [10] De la Fuente J., Monge A., Cocero MJ. y Barragan C. 1989b. Producción y conservación de embriones vacunos. 4º Congreso Internacional de Reprod. Anim. e I.A. León. p. 58.
- [11] Dieleman S.J. and Bevers M.M. 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG treated cow. J. Reprod. Fertil. 81: 533-542.
- [12] Dieleman S.J., Bevers M.M., Wurth YA., Gielen J.Th. and Willemse AH. 1989. Improved embryo yield and conditions of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the LH peak. Theriogenology. 31: 473-487.
- [13] Donaldson LE. 1985. Effect of insemination regimenes on embryo production in superovulated cows. Vet. Rec. 117: 35-37.
- [14] Donaldson LE. and Ward D.N. 1987. LH effects on superovulation and fertilization rates. Theriogenology 27: 225. Abst.
- [15] Farrant J., Lee M. and Walter C.A. 1979. Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival of cells. In: Ciba Found. Symp. n.52. The Freezing of Mammalian Embryos. Eds: K. Elliot and J. Whelan. Elsevier Amsterdam pp 49-65.
- [16] Fuentes S., Payas A., Ugarte C., Montoro L. y De la Fuente J. 1991. Tasas de gestación en el programa de T.E. del País Vasco..Resultados preliminares. ITEA 11, I: 73-75.
- [17] García GJK, Seidel GE Jr., Elsden RP. 1982. Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. Theriogenology. 17: 90-97.
- [18] Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. J. Reprod. Fertil. 87:223-230.
- [19] Greve T. 1982. Embryo transplantation in dairy cattle: An attempt to analyse factors that may affect embryo number and quality. In: 2nd World Conference on ET and IVF. Eds.: C. Merieux, M. Boneau, 251-276.
- [20] Guibault LA, Grasso F, Lussier JG, Roullier P, Matton P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle J. Reprod. Fertil. 91:81-89.
- [21] Hahn J., Hahn R., Baumgartner G., Lotthammer K.H., Lorrmann W., Schneider U., Traub J. and Zoder H.F. 1977). Experiments to improve results of ova collection and transfer in cattle by preselection of donors and recipients. Zuchthyg. 12: 68-76.
- [22] Hare W.C.D. 1985. Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. Office International des Epizooties. Technical Series n.4 (Paris).

- [23] Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donor recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27: 139.
- [24] Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*.19: 83-99.
- [25] Heape W. 1.890. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. Royal Society of London* 48: 457-458.
- [26] Holm P., Greve T. and Willeberg P. 1987. Description and analysis of factors influencing the response of 449 superovulated donors cows and heifers. *Theriogenology*. 27: 238.
- [27] IETS. Manual. 2000. Ed.: Stringfellow Da and Seidel SM. Champaign, USA. 79 pp.
- [28] Lerner SP., Thayne W.V., Baker RD., Henschen T., Meredith S., Inskeep E.K., Dailey R.A., Lewis PE. and Bucher RL. 1986. Age, dose of FSH and others factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63: 176-183.
- [29] Lindner GM., Anderson GB., Bon Dutant RM. and Cupps PT. 1983. Survival of bovine embryos stored at 4° C. *Theriogenology* 20:311.
- [30] Lindsell CE, Murphy BD, Mapletoft RJ. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26: 209-219.
- [31] Looney CR. 1986. Superovulation in beef females. *Proc. 5th Ann.Conv. AETA, Fort Worth, Texas.* 16-29.
- [32] Mariana JC. 1980. Some remarks on the long term trends and some short regulations in the follicular growth. 9th Inter. Cong. on Anim. Reprod. and A.I. Madrid, España. II: 79-94.
- [33] Massey J, Oden A. 1984. No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest of the USA. *Theriogenology* 21:196-217.
- [34] Mazur P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 168: 939.
- [35] Monniaux D, Chupoin D, Saumende J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19: 55-82.
- [36] Moor RM, Osborn J, Crosby I. 1985. Gonadotrophin-Induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J.Reprod.Fertil.*74:167.
- [37] Moor R.M., Kruip AM. and Grenn D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology* 21: 103-116.
- [38] Newcomb R., Rowson LEA. and Trounson A. 1976. The entry of superovulated eggs into the uterus. In "Eggs transfer in cattle" CEE Seminar 1-18.
- [39] Pawlyshyn V, Linsell CE., Braithwaite M., Mapletoft R.J. 1986. Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. *Theriogenology* 25:179.
- [40] Rall W.F., Reid DS. and Farrant J. 1980. Innocuous biological freezing during warming. *Nature* 286: 511.
- [41] Saumande J. and Chupin D. 1986. Induction of superovulation in cyclic heifers: the inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology* 25 (2): 233-247.

- [42] Seidel G.E. 1980. Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: Fertilization and Embryonic Development "in vitro". Ed. Mastroianni L. and Biggers J.D. Plenum Press. 323-353.
- [43] Singh EL. 2000. Potential of embryos to control transmission of disease: a review of current research. In: IETS Manual 11-21 (Champaign Ill. USA).
- [44] Stringefellow D.A., Lauerman L.H., Nasti K.B. and Galik P. K. 1990. Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious Bovine Rhinotracheitis Virus and Bovine Herpes Virus-4. *Theriogenology* 33: 331.
- [45] Thibier M. 1990. Le transfert embryonnaire: Le moyen le plus sur, au plan sanitaire, d'échange de genes. 6 Réunion A.E.T.E. Lyon. p. 67-81.
- [46] Thibier M. and Nibart M. 1987. Disease control of embryo importations. *Theriogenology* 27: 37-47.
- [47] Van Doormal, B. 1991. To flush or not to flush. *Canadian Holstein*. 12: 7-9.