



CEU

Facultad de Veterinaria

Universidad Cardenal Herrera

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN GANADO BOVINO

Trabajo Fin de Grado

Nuria Ponce Palau

05/06/2015





CEU

Facultad de Veterinaria

Universidad Cardenal Herrera

Revisión bibliográfica sobre la **“Transferencia de embriones en ganado bovino”**

Nuria Ponce Palau

5º de Grado en Veterinaria

Alfara del Patriarca, 5 de Junio de 2015

Resumen.

Actualmente existen diferentes técnicas de reproducción asistida para facilitar el trabajo en la granja. La tecnología MOET consiste en la multiovulación y transferencia de embriones, y es una de las técnicas reproductivas que se encuentran en auge en estos momentos. En animales de gran valor, esta técnica puede facilitar, por una parte, la conservación de genes maternos valiosos; y por otra, la producción de más de un ternero al año. Por todo ello, los objetivos de este trabajo son (1) revisar el proceso de transferencia embrionaria, (2) comparar los principales avances existentes en la actualidad y (3) establecer la combinación más útil a nivel de campo en vacuno lechero según dichas comparaciones. Tras la revisión bibliográfica determinamos que la sincronización de la donante con el uso de hormonas FSH es la más efectiva, mientras que la receptora mantendrá una presincronización de fácil adaptación a las tareas de los trabajadores; la recuperación de embriones se recomienda hacer con un medio comercial, del mismo modo que los lavados; y, en cuanto al futuro de estos, se tiene como objetivo la vitrificación con transferencia directa que, aunque actualmente no es una técnica puesta en marcha a nivel comercial, ya hay estudios alentadores al respecto.

Palabras clave: Transferencia, embriones, MOET, reproducción.

Abstract.

Nowadays, there are different assisted reproductive techniques to make easy the work at farm. The MOET technology involves superovulation and embryo transfer, and is one of the reproductive techniques that are booming right now. In genetically important cows, MOET technology must be considered to provide the genes preservation in the herd and to produce more than one calf in a year. Therefore, the objectives of this paper are (1) review the process of embryo transfer, (2) compare the main existing progress at present by the bibliographic

references and (3) establish the most useful combination to apply this technique in the farms. After the revision, we concluded that the best combination to apply the MOET technology in field is a synchronization of donor cows using FSH hormones and a comfortable presynchronization for the recipients cows; the embryo collection may be did with a commercial medium, like the wash. The objective about the future of embryos is vitrification with direct transfer, although now there are not launched commercially, there are studies that encourage it.

Índice:

1. Introducción.....	6
2. Hembra donante.....	6
2.1. Condiciones sanitarias.....	8
2.2. Tratamientos de superovulación.....	9
2.3. Recuperación embrionaria.....	16
2.4. Evaluación de los embriones.....	19
2.5. Lavados embrionarios.....	23
2.6. Sistemas de conservación.....	25
3. Hembra receptora.....	33
3.1. Condiciones sanitarias.....	34
3.2. Programas de sincronización.....	35
3.3. Transferencia del embrión.....	35
4. Conclusión.....	36
5. Bibliografía.....	38

Índice de tablas:

Figura 1	9
Figura 2	10
Figura 3	11
Figura 4	13
Figura 5	14
Figura 6	14
Figura 7	15
Figura 8	17
Figura 9	18
Figura 10	19
Figura 11	22
Figura 12	28
Figura 13	35
Figura 14	36

Índice de tablas:

Tabla 1	25
Tabla 2	27
Tabla 3	32

1. Introducción.

A lo largo del tiempo se ha buscado diferentes técnicas que facilitasen el manejo en la granja, como la inseminación artificial (IA) o la superovulación con transferencia de embriones (MOET). Esta última técnica permite que hembras seleccionadas genéticamente puedan incrementar su número de crías en un año, mejorando así tanto la capacidad productiva como el nivel genético de la granja.

Históricamente, aunque la transferencia de embriones comenzó a realizarse en 1890, no fue hasta 1950 cuando se aplicó al vacuno (Selk; 2002). Por aquel entonces, tanto la recuperación como la posterior transferencia de los embriones a la hembra receptora se realizaba de forma quirúrgica, haciendo inviable la aplicación de esta técnica de forma rutinaria en una explotación. A finales de 1970 se desarrollan las técnicas no quirúrgicas para estos procedimientos, momento en el cual se dispara el uso de la transferencia de embriones en los países más involucrados (Selk; 2002). Aunque muchos ganaderos opinan que no resulta rentable el empleo de estas tecnologías a nivel de granja por la complicación en el manejo, en la práctica real podemos observar como muchos países ya lo están empleando en animales valiosos, ya que resulta sencillo una vez se tiene el protocolo adaptado y se toma cierta práctica.

Actualmente, algunos estudios como el publicado por Kimura y Matsuyama en 2014, establecen que el porcentaje de concepción se mantiene entre el 40% y el 70%, dependiendo del tamaño del embrión en el momento de la transferencia. Además, estos parámetros también variarán según si el embrión se mantiene en fresco o ha sido congelado o vitrificado.

2. Hembra donante.

La tecnología MOET resulta muy útil por varias razones, bien sea porque la madre no está capacitada para llevar la gestación adelante (problemas de implantación embrionaria, fibrosis uterina, etc), para la

producción rápida de terneros o para la conservación de estos genes. Por lo tanto, aunque no es estrictamente necesario, el primer paso es establecer un criterio de selección genética de la madre, ya que es un proceso costoso y no resulta rentable en vacas sin importancia genética.

Este animal será sometido, en primer lugar, a un análisis general para verificar que cumple las condiciones sanitarias y fisiológicas adecuadas para que el embrión sea viable. Últimamente se están estudiando los niveles adecuados de Hormona Anti-Mülleriana (AMH) para la determinación de la reserva folicular de las donantes (Vernunft *et al*; 2015). Esta hormona es una glicoproteína producida específicamente en las gónadas; en el caso de las hembras, en las células de la granulosa de los folículos antrales y preantrales (Souza *et al*; 2014), y puede ayudar en la selección de hembras con buena capacidad de respuesta a la superovulación. Mientras que algunos autores, como Rico *et al* (2012) determinaron que una vaca con alta capacidad de superovulación debe tener unos niveles superiores a 87pg/mL (15 folículos) y 74pg/mL (10 folículos) de AMH sérica para ser aptas para las técnicas MOET, autores como Vernunft *et al* (2015) concluyen que aunque es un buen marcador general para la selección de estos animales, no es eficaz su uso único como referente. Siguiendo estos artículos, podemos decir que la AMH es un excelente indicador de la capacidad ovárica de las hembras a tener en cuenta en los análisis, pero no de forma única.

Los valores productivos y reproductivos también serán evaluados, tanto los suyos como los de sus progenitores. Tras todos los análisis y exámenes pertinentes, es importante esperar que pase un mínimo de 60 días desde el último parto y observar al animal durante al menos dos celos para asegurar tanto una correcta involución uterina como la regularidad y aspecto de estos (Selk; 2002).

Una vez ha pasado este segundo celo, se puede comenzar el tratamiento superovulatorio para poder reclutar el mayor número de embriones posible, para lo cual expondremos las diferentes hormonas

utilizables y los protocolos más habituales. Por último, se recogerán estos embriones para poder clasificarlos, valorar su estado y bien aplicarlo en fresco a la vaca donante o bien congelar/vitrificar para su conservación.

2.1. Condiciones sanitarias.

Antes de comenzar con este proceso, es importante determinar que el animal donante cumple todos los requisitos necesarios, tanto sanitarios como fisiológicos, para que la transferencia sea exitosa. Siguiendo el Real Decreto 855/1992, del 10 de Julio de 1992, se establece que sanitariamente una vaca donante ha de proceder de un rebaño:

- Indemne de tuberculosis.
- Indemne de brucelosis.
- Indemne de leucosis enzoótica bovina o sin casos clínicos en los últimos 3 años.
- Sin casos clínicos de rinotraqueítis infecciosa bovina/ vulvovaginitis purulenta infecciosa.

Además, la condición corporal estará en torno al 3,5/5, la alimentación será adecuada para su estado productivo y no presentará ninguna patología. El día de la observación general y el día de la recogida de los embriones, el animal no debe mostrar clínica de ninguna patología.

Junto a las anteriores condiciones, esta donante debe cumplir ciertas expectativas en cuanto a características reproductivas (Selk; 2002), como son:

- Ciclos estrales regulares comenzados a edad adecuada.
- Historia de no haber necesitado más de dos inseminaciones por concepción.
- No haber tenido problemas en partos anteriores.
- No haber sufrido irregularidades reproductivas.
- No tener defectos conformacionales.

- No tener defectos genéticos detectables.

2.2. Tratamientos de superovulación.

Conocemos que la vaca es una especie monotoca, por lo que si el óvulo que produce en cada ciclo estral queda fecundado pasaría a producir un ternero al año. En los programas MOET queremos recuperar varios embriones por ciclo en una hembra donante para poder transferirlos a las receptoras, de modo que recurriremos a un programa de sincronización y superovulación para hacer viable esta idea y conseguir varios ovocitos fecundantes en el momento de la inseminación artificial.

Antes de iniciarse el tratamiento de superovulación hemos de asegurar que los ciclos estrales de esta hembra son normales y existe un cuerpo lúteo normal por medio de palpación rectal o ecografía para establecer un punto de partida (Stringfellow y Givens; 2010). Actualmente, se realiza una presincronización de estas vacas para no tener que examinar los ovarios de todas las hembras que se vayan a sincronizar, y así establecer un punto inicial de una forma sencilla.

Para saber en qué momento del ciclo nos encontramos, debemos detectar que existe un cuerpo lúteo sobre el que actuar.

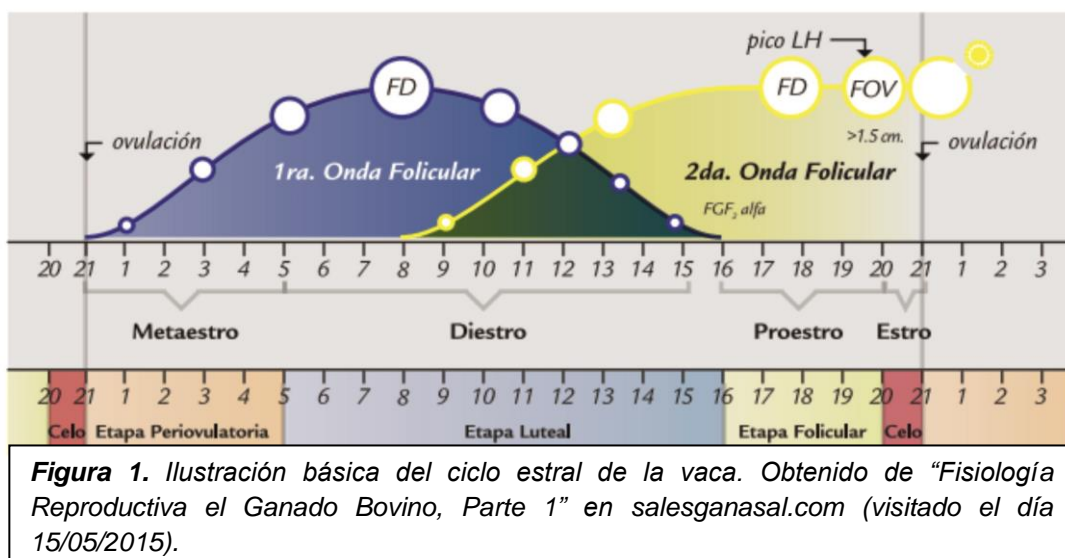


Figura 1. Ilustración básica del ciclo estral de la vaca. Obtenido de "Fisiología Reproductiva el Ganado Bovino, Parte 1" en salesganasal.com (visitado el día 15/05/2015).

Para poder sincronizar este momento, se pueden emplear diferentes técnicas, tanto químicas como físicas. En los países donde los estrógenos están permitidos, resulta muy útil el uso de estradiol el día 0, momento en el cual se introduce un dispositivo liberador de progesterona (P4) como el CIDR (Bó y Mapletoft; 2015). En Europa esto no es posible, por lo que se puede realizar bien una ablación folicular o bien una presincronización con tratamientos hormonales a base de progesteronas (P4), prostaglandinas (PGF) y GnRH (hormona liberadora de gonadotropina). La primera opción, ya en desuso, consiste en la aspiración ecoguiada de los folículos mayores de 5mm para posteriormente insertar un dispositivo CIDR. El tratamiento con FSH se iniciará tras 24-48 h (Bó y Mapletoft; 2015). Por otra parte, la presincronización mediante el uso de GnRH consiste en la administración de esta cuando existan folículos dominantes, de modo que se producirá la ovulación de estos y, tras dejar pasar este celo, podremos comenzar con una onda folicular nueva (Bó y Mapletoft; 2015).

Si no se encuentran folículos dominantes, se realizará una presincronización más detallada, donde se comenzará con la administración de una PGF junto a la colocación de un dispositivo CIDR (Figura 2). Siete días después se estimulará la ovulación con una dosis de GnRH (Bó y Mapletoft; 2015). Pasadas 36 h se comenzará el estímulo con FSH, como se detalla a continuación.

CIDR	GnRH	FSH	FSH	FSH	FSH	FSH	CIDR	GnRH	IA	IA		Recolección de embriones
							FSH					
PGF							PGF					
am	pm	am	pm	am	pm	am	pm	am	pm	am		
-8	-1	0		3		4		5		6		12

Figura 2. Esquema básico de un sistema de presincronización con FSH de origen porcino (FSH-p) en vacas donantes de embriones, con ayuda de implantes de progesterona para una mayor precisión (CIDR: Dispositivo liberador de progesterona, GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas, FSH: Hormona folículo estimulante, PGF: Prostaglandina, IA: Inseminación artificial).

TIPOS DE FSH:

1. FSH PORCINA (FSH-p) Y FSH OVINA (FSH-o).

El uso de FSH-p es el más empleado de los tres tratamientos que se van a exponer, ya que fue el primero en desarrollarse y el que mejores resultados aportaba. Esta técnica se suele iniciar alrededor de los días 8-14 del ciclo estral, ya que como vemos en la *Figura 1*, se encuentra la fase de transición entre la degeneración del cuerpo lúteo de la primera onda folicular y el reclutamiento folicular de la segunda onda (Görlach; 1997).

Aunque los protocolos que se pueden llevar a cabo a partir de esta hormona son muy diversos, el esquema general se centra la inoculación de FSH-p cada 12 h a dosis decrecientes durante un periodo aproximado de 4 días, dependiendo del protocolo. El último día de tratamiento se aplica también una PGF cada 12 h, tras lo cual se observará el celo y, 12-24-36 h después de la detección del celo se realizará la inseminación artificial (*Figura 3*) con el fin de asegurar la fecundación del animal (Görlach; 1997). Si se considera, se puede inducir la ovulación con GnRH o hCG (gonadotropina coriónica humana) 24 h después del cese de la administración de FSH.

FSH	FSH	FSH	FSH	FSH	FSH	FSH	FSH	CELO	IA	IA	IA		Recolección de embriones
						PGF	PGF						
am	pm	am	pm	am	pm	am	pm		am	pm	am		
15		16		17		18		19	20		21		27

Figura 3. Esquema básico de un sistema de sincronización con FSH de origen porcino (FSH-p) en vacas donantes de embriones (FSH: Hormona folículo estimulante, PGF: Prostaglandina, IA: Inseminación artificial).

El principal problema que encontramos en esta técnica es el difícil manejo de los animales y el posible estrés que esto les suponga, ya que hay que pincharles cada 12 h. Aun así, esto no parece tener mayor importancia, puesto que en la actualidad son las más utilizadas por sus

altos resultados en cuanto a reclutamiento de óvulos fecundantes en el momento de la inseminación.

Los diferentes tipos de hormonas FSH que podemos encontrar en el mercado son:

- FSH-p: Origen porcino.
 - Folltropin V® (Bioniche Animal Health Inc., Canadá).
 - Pluset® (Calier, España).
 - Stimufol® (Merial, Francia).
- FSH-o: Origen ovino.
 - Ovagen® (Comextrade, Nueva Zelanda).

2. FSH recombinante (FSH-Rb).

Las gonadotropinas recombinantes pueden ayudar en la superovulación de las vacas facilitando su administración, ya que en diversos estudios se ha determinado que su efecto tiene lugar durante largos periodos de tiempo, por lo que tan solo haría falta una administración de esta.

El estudio realizado por Carvalho *et al* (2014) determinó un protocolo de sincronización y superovulación de las hembras a partir de una sola administración de FSH-Rb. Este proceso se observa resumido en la *Figura 4*; comienza en un punto aleatorio del ciclo estral, ya que todos los folículos mayores de 5mm se aspiran de forma ecoguiada. 36 h después se coloca un dispositivo liberador de progesterona (CIDR) y se inicia el tratamiento superovulatorio con una única inyección de FSH-Rb, y a las 48 y 72 h se administrará una PGF. El dispositivo CIDR permanecerá en la hembra tan solo 84 h, por lo que pasado este tiempo se retirará y, 24 h más tarde, se estimula la ovulación con una inyección de hCG. Después de esta estimulación se inseminan las hembras en dos ocasiones con unos periodos de 12h entre ellas.

Aspiración de los folículos	CIDR		PGF	PGF		CIDR		hCG	IA	IA	Recolección de embriones
	FSH										
	am		am	pm		pm		pm	am		
0	2		4		5		6		7		13

Figura 4. Esquema básico de sincronización de hembras donantes de embriones mediante el uso de FSH recombinante (FSH-Rb) con presincronización con CIDR (CIDR: Dispositivo liberador de progesterona, FSH: Hormona folículo estimulante, PGF: Prostaglandina, hCG: Gonadotropina coriónica humana, IA: Inseminación artificial).

Este sistema de superovulación nos muestra como la FSH-Rb es una gran alternativa para facilitar la administración de hormonas necesarias sin tener que emplear eCG (Bó y Mapletoft; 2014), y a pesar de no encontrarse actualmente en el mercado, existen estudios que animan a un futuro uso de esta hormona.

HORMONAS CON EFECTO FSH:

1. eCG.

La “Gonadotropina Coriónica Equina” (eCG) comenzó a emplearse en la superovulación por su larga vida media. Esta hormona comenzó a utilizarse antes que las FSH, empleándose únicamente una dosis, pero la superovulación resulta menos efectiva. Esta ejerce su efecto durante más de 10 días, por lo que siempre que se emplea se debe tener en cuenta para poder administrar un suero anti-eCG y así cesar el efecto y no producir quistes foliculares.

El esquema general que sigue una superovulación con eCG se puede observar en la *Figura 5*, y se centra en la administración de esta hormona alrededor del día 15 del ciclo estral, el cual aseguraremos a partir de palpación rectal y ecografía o mediante una presincronización. Tres días después se administrarán dos dosis de una PGF con un intervalo de 12 h entre sí, de modo que al día siguiente presentará celo y

12-24-36 h después se realizarán las consecuentes inseminaciones artificiales (Görlach; 1997).

eCG	PGF	PGF	CELO	IA	IA Anti-ecG	IA		Recolección de embriones
	am	pm		am	pm	am		
15	18		19	20		21		27

Figura 5. Esquema básico de sincronización de hembras donantes de embriones mediante el uso de eCG (eCG: Gonadotropina coriónica equina, PGF: Prostaglandina, IA: Inseminación artificial).

Es importante prestar atención a las posibles reacciones adversas de esta hormona, ya que en algunos animales puede provocar anticuerpos anti-eCG. Si esto ocurriera se necesitaría, bien el empleo de más dosis de esta hormona en las siguientes sincronizaciones para alcanzar el mismo efecto, o bien pasar a utilizar la hormona presentada a continuación (Görlach; 1997).

2. hMG.

La hormona menopáusica humana (hMG) tiene un efecto y una vida media similar a la FSH, por lo que los protocolos a seguir con esta los observamos en la *Figura 6*, y son los mismos que con la FSH. Las principales diferencias entre la hMG y la FSH es el coste mucho más elevado que tiene esta primera, por lo que su uso tan solo se dará cuando el animal haya desarrollado anticuerpos como respuesta a los tratamientos con eCG o FSH (Görlach; 1997).

hMG	hMG	hMG	hMG	hMG	hMG	hMG	hMG	CELO	IA	IA hCG	IA		Recolección de embriones
						PGF	PGF						
am	pm	am	pm	am	pm	am	pm		am	pm	am		
15		16		17		18		19	20		21		27

Figura 6. Esquema básico de sincronización de hembras donantes de embriones mediante el uso de hMG (hMG: Hormona menopáusica humana, PGF: Prostaglandina PGF, IA: Inseminación artificial, hCG: Gonadotropina coriónica humana).

El tratamiento con hMG tiene los mismos resultados que el tratamiento con FSH-p en cuanto a número de embriones transferibles, pero los conseguidos con la primera técnica tienen una menor tasa de adaptación (Alcivar *et al*; 1992).

3. FSH-p + eCG.

Un estudio realizado por Mattos *et al* (2011) realiza una sincronización de superovulación en hembras donantes empleando una combinación entre FSH-p y eCG para conocer si mejorando el manejo se podrían conseguir mejores resultados en la superovulación. El grupo de animales sometidos a esta combinación pasaron por una presincronización con la siguiente aplicación de un dispositivo CIDR el día 0 para establecer un punto de partida en el proceso. A continuación, el día 4 se comenzaron a aplicar dosis decrecientes de FSH cada 12 h durante 3 días; ya que al cuarto día se administraron dos dosis de eCG junto a dos dosis de PGF. En el momento de la última inyección de eCG y PGF se retira el dispositivo CIDR y se induce la ovulación con una inyección de GnRH 18 h más tarde. La inseminación artificial se produce a las 6 y 18 h tras esta dosis de GnRH (Figura 7).

CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH	FSH	FSH	eCG	CIDR	GnRH	IA	IA	Recolección de embriones
							PGF	eCG				
	am	pm	am	pm	am	pm	am	pm		am	pm	
0	4		5		6		7		8	9		

Figura 7. Esquema básico de sincronización de hembras donantes de embriones mediante el uso de una combinación de FSH + eCG (FSH: Hormona folículo estimulante, eCG: Gonadotropina coriónica equina, PGF: Prostaglandina, IA: Inseminación artificial, CIDR: Dispositivo liberador de progesterona, GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas).

Esta prueba concluyó con unos resultados favorables respecto a la combinación de FSH + eCG en cuanto a número de folículos producidos; pero la tasa total de fecundación resulta similar tanto en este sistema

como en la administración de FSH-p. Por esto, podemos decir que este sistema resulta poco útil, ya que hemos de tener en cuenta que la eCG puede necesitar el empleo de su antagonista para neutralizar el efecto, que puede alargarse y provocar bajas tasas de ovulación, por lo que tampoco resulta muy práctico su uso.

2.3. Recuperación embrionaria.

Este proceso es relativamente sencillo, pero si la vaca es nerviosa es preferible realizar una anestesia epidural para asegurar que no se producen daños. Esta técnica requiere de mucha paciencia y material especializado estéril. El material necesario para esta técnica es (Robertson; 2015):

- Catéter de 52cm de silicona.
- Fiador de 60cm.
- Una llave de tres vías, con un extremo adaptado al catéter de recolección y los otros dos conectados a canales de entrada y salida del líquido de recolección.
- Una jeringa de 10mL y otra de 60mL.
- Filtro de recogida de embriones.
- Dilatador cervical.
- Líquido de recogida.
- Gelatina sin espermicida, especial para la recogida de embriones.

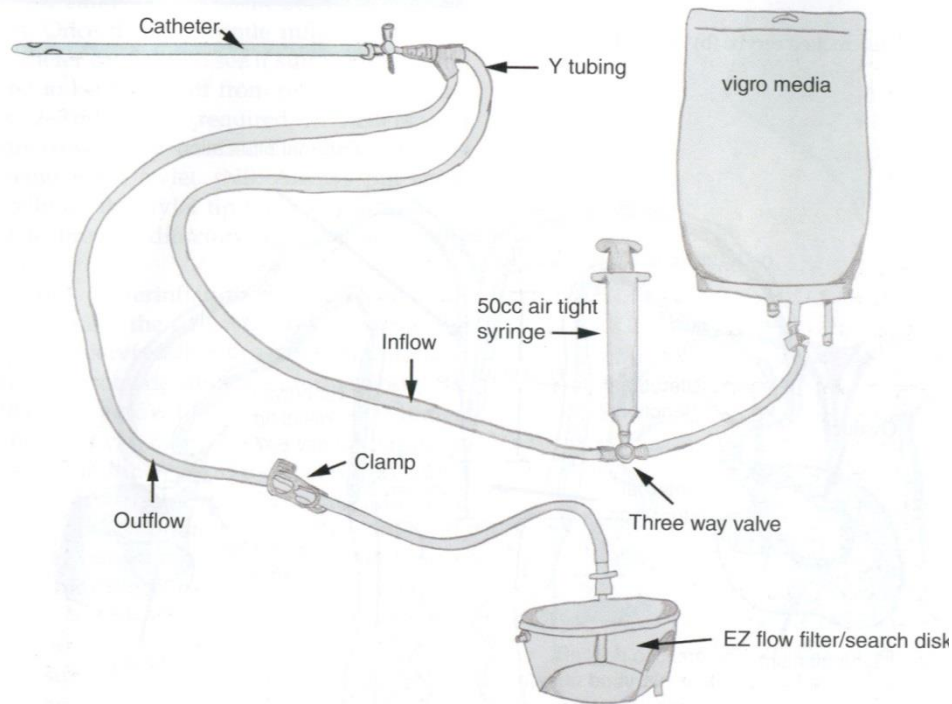


Figura 8. Sistema de recolección de embriones bovinos. Obtenido de Robertson (2015).

En la imagen anterior (Figura 8) podemos observar un esquema sencillo sobre el material necesario para la recolección adecuada de embriones bovinos. El medio de recolección empleado suele ser una preparación comercial que contiene surfactante y antibióticos como la gentamicina y la kanamicina (Robertson; 2015). Por otra parte, algunos veterinarios emplean Ringer Lactato al que añaden 0,01% de albúmina sérica bovina como surfactante (Robertson; 2015), siendo igual de efectivo y más barato si se va a emplear para técnicas rápidas. Por otra parte, en algunos países no aceptan estos embriones porque el empleo de la albúmina sérica bovina supone un riesgo en la transmisión de encefalopatías espongiformes, por lo que es sustituida por PVA (alcohol polivinílico).

Siete u ocho días después del celo, se introduce un catéter de silicona por el cérvix con ayuda de un fiador hasta llegar al cuerpo del útero (Selk; 2002), evitándose siempre la lesión de cualquiera de estas estructuras para que la recolección sea exitosa y no haya problemas en un futuro. Si

se observan dificultades para este proceso, que debería resultar sencillo por su parecido a la inseminación artificial convencional, se recurrirá al empleo del dilatador cervical, pero nunca se forzará el paso del catéter. Es entonces cuando el manguito se llena lentamente con unos 2 mL de suero salino, se tira ligeramente hasta bloquear el orificio del cérvix y se termina de rellenar con este líquido.

A continuación, se conecta este catéter a un tubo de entrada de líquido de recogida (inflow) y a otro tubo de salida para este líquido (outflow) mediante la llave de tres vías. El tubo de *inflow* se colocará en la parte alta de la vaca, y el *outflow* en la parte baja, de modo que el líquido es introducido y recogido más fácilmente por gravedad. Conforme se va introduciendo el líquido se ha de hacer un masaje uterino por vía rectal haciendo hincapié en el primer tercio del cuerno uterino. Para saber la cantidad de líquido que hay que introducir, a la palpación debe dar la sensación de que estamos ante una gestación de 40 días, que será alrededor de un litro (Selk; 2002). En la *Figura 9* podemos observar como uno de los cuernos puede ser bloqueado con los dedos para que el líquido de recuperación vaya al cuerno contrario, ya que en ocasiones el catéter queda en dirección a uno de los dos cuernos, lo que provocaría un mal lavado si no se tiene en cuenta este detalle.

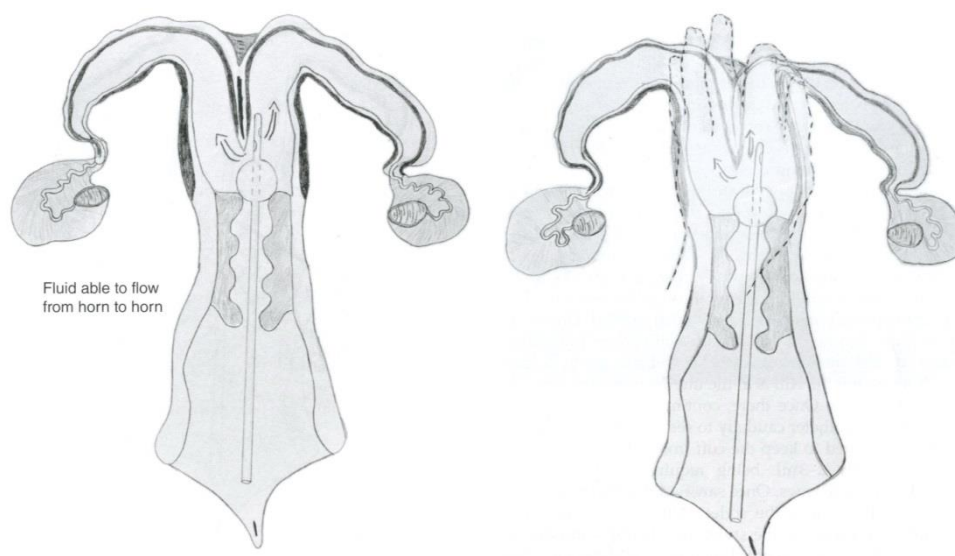


Figura 9. Explicación de cómo asegurar el llenado de ambos cuernos uterinos mediante la compresión de uno de ellos. Obtenido de Robertson (2015).

Una vez recolectado todo el líquido, los embriones deberían haber quedado en el filtro colocado anteriormente en la zona de *outflow*, de modo que se observará este en un estereomicroscopio para verificar la presencia de embriones y la viabilidad de estos.

2.4. Evaluación de los embriones.

Los mejores valores que predicen la adecuada viabilidad de los embriones son la fase de desarrollo según el tiempo pasado desde la ovulación, y el estado general de estos. Por lo tanto, una vez se han recogido hay que clasificarlos por estos criterios. Esta categorización resulta bastante subjetiva, pero para poder establecer un criterio internacional, la “*Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones*” (IETS) ha establecido ciertos grados atendiendo a: forma y tamaño de los embriones y los blastómeros; color, textura del citoplasma y la presencia de vesículas en este; existencia o ausencia de células anómalas y regularidad de la zona pelúcida (Selk; 2002). La siguiente imagen (Figura 10) muestra los principales puntos de fijación para poder clasificar los embriones:

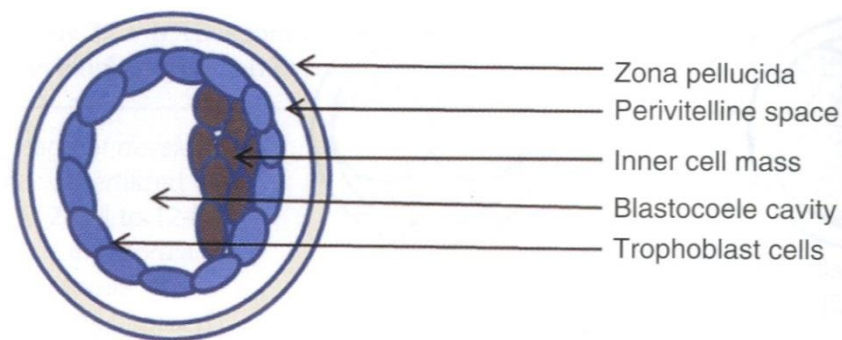


Figura 10. Ilustración de un blastocisto que nos muestra las diferentes zonas donde hemos de fijarnos para la buena clasificación de los embriones. Obtenido de Jahnke et al (2015).

En primer lugar, para establecer correctamente los criterios anteriormente citados es muy importante saber a qué día de la ovulación nos encontramos, por lo que se suelen recoger entre los días 6 y 8 días tras esta. Ante todo debemos cuidar que estos embriones se conserven en buen estado durante el proceso, por lo que se mantendrán en un

medio específico, normalmente el líquido de recolección, a unos 20-30°C (Stringfellow y Givens; 2010). Para poder examinarlos completamente, se pondrán en un plato de retención y se observarán al estereomicroscopio a 50-100x aumentos, girándolos si es necesario para observar que la zona pelúcida se mantiene intacta (Bó y Mapletoft; 2013).

La clasificación según el estado de desarrollo va desde el estadio “1” (ovocito sin fecundar) hasta el número “9” (blastocisto expandido eclosionado); mientras que el estado cualitativo se clasifica del “1” (excelente/bueno) al “4” (muerto/degenerado). A continuación se expondrán y explicarán brevemente cada una de estas clasificaciones:

Clasificación según el estado de desarrollo (revisado en Jahnke et al; 2015):

1. Sin fecundar. Tan solo se observa una célula ocupando el espacio embrionario, por lo que se puede asumir que corresponde con un ovocito sin fecundar. Mantiene una zona pelúcida intacta, una membrana vitelina completamente esférica, granularidad del citoplasma uniforme y un espacio vitelino moderado.
Es muy importante poder diferenciar esta estructura de un estadio 4 (mórula), ya que como se podrá observar en la *Figura 11*, es muy fácil confundirlos por el parecido morfológico de ambos.
2. 2-12 células. Se suele encontrar en el oviducto, en hembras donde la recogida se ha llevado a cabo alrededor de los 5 días tras el celo, por lo que si lo encontramos en hembras donde la recogida ha sido en los días 6-8 suele indicar muerte o degeneración.
Estas estructuras no se considerarán viables ni para criopreservación ni para transferencia en fresco.
3. Mórula joven. Encontramos alrededor de 16 blastómeros en el interior, pero es difícil diferenciarlos entre ellos por la superposición que hay, de modo que ocupan gran parte del espacio perivitelino.
Este estadio se puede considerar para la transferencia en fresco, pero no aporta buenos resultados si se utiliza para la conservación.

4. Mórula compacta. Los blastómeros están aglomerados, ocupando alrededor del 60-70% del espacio perivitelino, por lo que resulta imposible diferenciarlos.
5. Blastocisto joven. La principal característica del blastocisto es la presencia de líquido en la cavidad denominada “blastocelo”. Los trofoblastos ya diferenciados son fácilmente visibles entre el blastocelo y la zona pelúcida. Las células que componen el embrión ocupan aproximadamente el 70-80% del espacio perivitelino.
6. Blastocisto. Aquí la cadena de trofoblastos se diferencia claramente, gracias también al gran tamaño que mantiene el blastocelo. A no ser que el embrión esté parcialmente colapsado, no encontraremos líquido presente en el espacio perivitelino.
7. Blastocisto expandido. Este estadio es el primero que aumenta su tamaño considerablemente en comparación a los anteriores, el blastocelo ocupa gran parte del espacio interior y el espacio perivitelino desaparece. La zona pelúcida disminuye su grosor hasta aproximadamente un tercio de su grosor inicial.
8. Blastocisto eclosionado. El blastocisto eclosionado bien se puede encontrar totalmente liberado de la zona pelúcida como en proceso de estarlo. Los embriones aquí ya son completamente esféricos, con un blastocelo marcado. Este estadio puede resultar complejo de identificar porque en ocasiones se encuentra colapsado, haciéndolo fácilmente confundible con una pieza de tejido endometrial porque carece de zona pelúcida.
No se recomienda el empleo de estos embriones para el comercio, ya que al no existir zona pelúcida no pueden ser sometidos a los lavados y procesos establecidos por la IETS para estos.
9. Blastocisto expandido eclosionado. El blastocisto expandido eclosionado es idéntico al estadio anterior, excepto por el tamaño.

No se suelen encontrar estas estructuras si el lavado uterino se ha realizado antes del día 8 tras el celo; y atendiendo a las características de este, tampoco se recomienda para el comercio.

Los estadios del 1 al 6 mantienen un diámetro que ronda los 150-190µm con una zona pelúcida de 12-15µm. Los estadios del 7 al 9 son 1,5-1,9 veces más grandes que los anteriores por el aumento del volumen del blastocele. Las diferentes fases embrionarias se pueden observar de forma esquemática en la *Figura 11*.

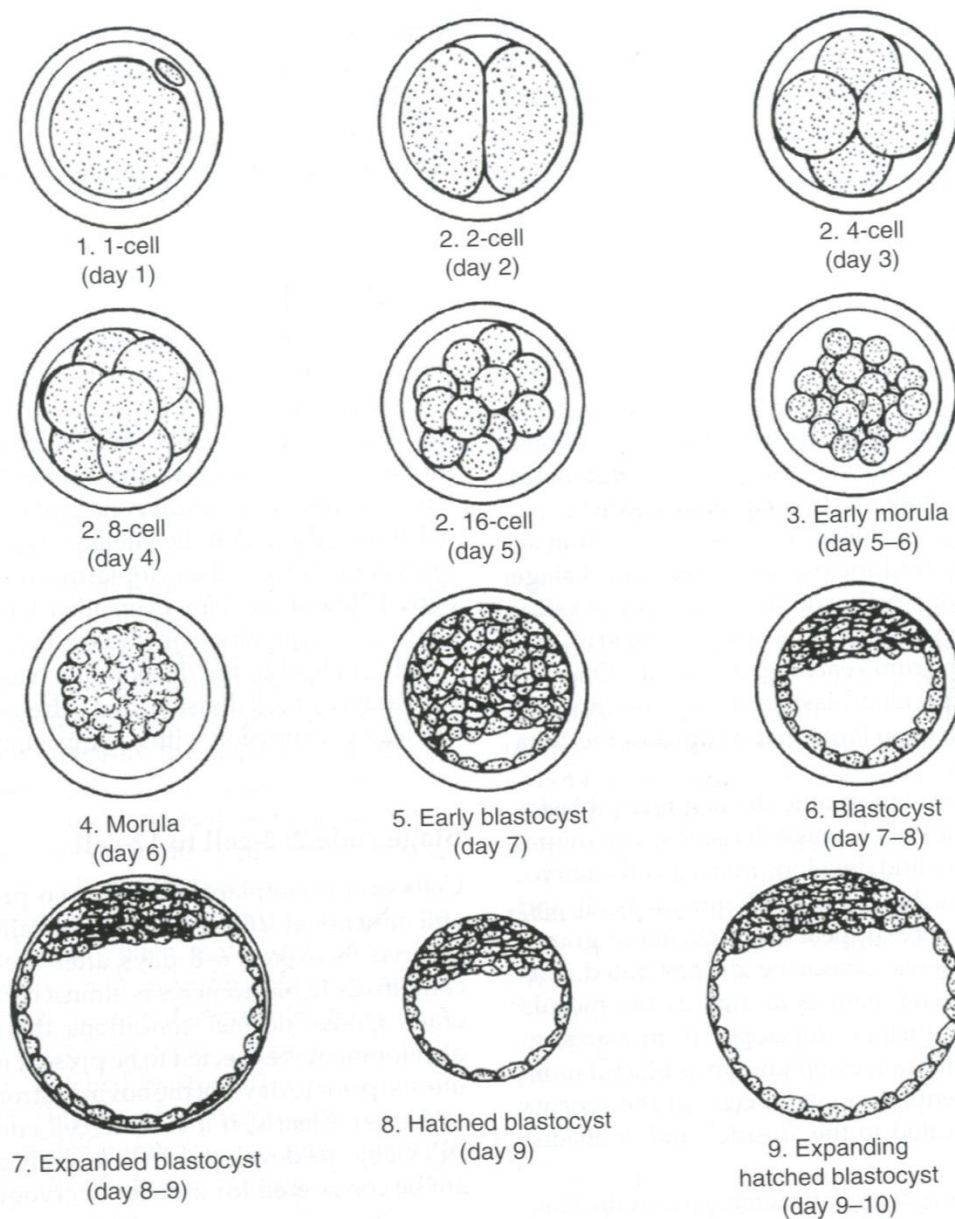


Figura 11. Esquema gráfico de todos los estadios embrionarios posibles en la clasificación 1-9 marcada por la IETS. Obtenido de Jahnke et al (2015).

Clasificación según calidad celular (revisado en Jahnke *et al*; 2015):

1. Excelente o bueno. El embrión es simétrico y esférico, con los blastómeros del mismo color, tamaño y densidad. Para asegurar este grado debe tener un mínimo del 85% de las células intactas, viables y formando una masa consistente; la zona pelúcida debe presentarse lisa, completa y sin zonas cóncavas.
Este tipo de embriones están capacitados tanto para su transferencia en fresco como para su conservación.
2. Mediocre. Debe presentar un mínimo del 50% de las células intactas. Dentro de los blastómeros podemos encontrar pequeñas alteraciones en la pigmentación o vacuolas.
La conservación de estos embriones puede disminuir gravemente su viabilidad una vez transferidos, por lo que se recomienda transferirlos en fresco.
3. Malo. Tan solo el 25% de las células embrionarias son adecuadas, y las alteradas presentan variaciones en el tamaño, color, vacuolización y pigmentación citoplasmática.
No se recomienda su transferencia si existen otras posibilidades, ya que la viabilidad de estos embriones es prácticamente nula.
4. Muerto o degenerado. En este grado de calidad se encuentran aquellas células completamente inviables, identificadas por su citoplasma oscuro, con prácticamente todas las células afectadas.
Estos embriones deben rechazarse inmediatamente, no son útiles para ningún uso.

2.5. Lavados embrionarios.

La zona pelúcida es esencial para el mantenimiento del embrión, ya que lo protege de posibles patógenos (Van Soom *et al*; 2010). Para poder evaluar y transferir los embriones de una forma segura y viable es muy importante eliminar cualquier impureza que pueda quedar de la recolección. Para esto, se suelen realizar una serie de lavados que eliminan las impurezas y la mayoría de parásitos, bacterias y virus. “Los

embriones expuestos a los virus requieren de un tratamiento con enzimas para asegurar que estén libres de infección” (Stringfellow y Givens; 2010), ya que aunque es poco frecuente que puedan penetrar la zona pelúcida, sí pueden quedar adheridos a esta hasta poder actuar en el momento de su desaparición (Van Soom *et al*; 2010).

En cuanto a patógenos como *Neospora caninum*, estudios como el publicado por Baillargeon *et al* (2010) determinan el lavado establecido por la IETS resulta efectivo en embriones seropositivos, ya que el análisis de estos una vez nacidos mostraron seronegatividad en todos los casos (n=70).

Con el objetivo de asegurar la salubridad de los embriones recolectados, el manual de la IETS (Stringfellow y Givens; 2010) establece un protocolo de lavado. Este proceso consiste en:

1. Cinco lavados de solución salina, PBS, antibióticos (suelen ser gentamicina y kanamicina) y Albúmina Sérica Bovina (BSA-V).
2. Se añaden dos gotas de una solución de tripsina al 25% (pH 7,6-7,8) durante 60-90 seg.
3. Se vuelve a lavar otras cinco veces, esta vez con una solución de PBS, antibióticos y un 2% de suero.

La sustitución de la BSA-V por el suero en este segundo lavado nos asegura la inactivación total de la tripsina, por lo que no será perjudicial para el embrión.

En la *Tabla 1* mostrada a continuación podemos encontrar los tratamientos que recomienda la Organización internacional de Epizootias (OIE) para los diferentes patógenos que podemos encontrar en nuestros embriones (OIE; 2014). Aunque puedan aparecer agentes patógenos en los embriones, siempre debemos elegir hembras donantes ausentes de estas.

ENFERMEDAD	TRATAMIENTO
Lengua azul	Lavado
Encefalopatía espongiforme bovina	Lavado
<i>Brucella abortus</i>	Lavado
Leucosis enzoótica bovina	Lavado
Fiebre aftosa	Lavado
Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR)	Tratamiento con tripsina

Tabla 1. Lavados y tratamientos recomendados por la OIE para la eliminación de diferentes patógenos de los embriones bovinos. Obtenido de OIE (2014).

2.6. Sistemas de conservación.

Una vez realizados todos los pasos citados previamente de forma adecuada obtendremos unos embriones limpios y clasificados por calidad y estado de desarrollo. A partir de aquí se puede bien transferir el embrión en fresco a unas hembras receptoras que estén sincronizadas, o bien conservarlos en frío para su posterior utilización.

Para minimizar los daños producidos en los embriones durante el enfriamiento de estos, es importante que no se formen cristales de hielo, para lo cual deben ser deshidratados parcialmente (Orlando y Sandra; 2012). Estos cristales podrían producir lesiones osmóticas y tóxicas en la membrana celular, por lo que se ha desarrollado el empleo de crioprotectores, sustancias que permiten la deshidratación parcial de las células durante el proceso de criopreservación sin formación de cristales y previniendo la degeneración proteica. Estos se pueden clasificar en dos grupos: penetrantes y no penetrantes, y se observan en la *Tabla 2* (Bondioli; 2015).

Crioprotectores penetrantes.

En este grupo encontramos sustancias de bajo peso molecular capaces de entrar en la célula por su estructura polar, produciendo su deshidratación parcial. A pesar de tener una baja toxicidad, no se recomienda su uso en altas concentraciones porque puede causar daño osmótico incluso sin llegar a refrigerarse (Arav; 2014). Por ejemplo, el etilenglicol (EG) puede resultar tóxico a concentraciones de 7,2Mol/L, mientras que a concentraciones de 3,6Mol/L la viabilidad se mantiene similar entre los embriones vitrificados y los frescos (Orlando y Sandra; 2012). Actualmente, la combinación más utilizada para reducir la toxicidad y mantener las cualidades crioprotectoras está basada en DMSO y EG (Arav; 2014).

En estos grupos encontramos compuestos como el glicerol (GLI), EG, propilenglicol (PE), etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) y el 1-2 propanediol (PROP) (Bondioli; 2015).

Crioprotectores no penetrantes.

Los crioprotectores no penetrantes son estructuras de alto peso molecular que no tienen capacidad de traspasar la membrana celular, por lo que ejercen su acción desde el exterior de esta, afectando a la osmolaridad del agente congelante y proporcionando estabilidad a la membrana celular.

Dentro de este grupo encontramos macromoléculas como la sucrosa, glucosa, dextrosa, trealosa o el polivinil-pirrolidona (PVP), aunque uno de los más empleados es la sucrosa (Orlando y Sandra; 2012).

	PENETRANTE	NO PENETRANTE
CONGELACIÓN LENTA	GLI	Sucrosa
	EG	
VITRIFICACIÓN	GLI	Sucrosa
	EG	
	DMSO	
	PROP	

Tabla 2. Diferentes agentes crioprotectores, características de acción y su principal uso (DMSO: Dimetil-sulfóxido).

Las dos principales formas de criopreservación son la congelación y la vitrificación. Mientras que en la primera técnica la elección de los crioprotectores se centra en un solo grupo (principalmente penetrantes), en la vitrificación se suelen emplear combinaciones mucho más variadas de crioprotectores de ambos grupos mezclados.

Congelación lenta (revisado en Bondioli; 2015).

Para la congelación lenta es muy importante emplear un medio de enfriamiento adecuado. Tradicionalmente se ha utilizado una solución tampón a base de suero salino fosfatado con BSA, pero en la actualidad hay en el mercado soluciones comerciales que permiten el reemplazo del suero salino fosfatado por MOPS (ácido 3-N-mofolino propanosulfónico) o HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazina tenosulfónico) y, lo que resulta más interesante para la comercialización de los embriones a terceros países, el empleo de PVP en lugar del BSA.

Este método de criopreservación se lleva a cabo a partir de una reducción lenta y controlada de la temperatura, de modo que se produzcan cristales fuera de las propias células embrionarias. Los pasos a seguir en esta técnica son:

1. Adición de crioprotectores. Inicialmente se pensaba que este estrés osmótico al que están sometidos los embriones podía reducir su viabilidad, por lo que se comenzaron a introducir en medios de protección durante un mínimo de 10 min. para evitar su posterior

destrucción. Los crioprotectores más utilizados para esta técnica son el GLI a una concentración de 1,4Mol/L y el EG a una solución de 1,5Mol/L.

2. Envasado de los embriones. El material de las pajuelas debe ser capaz de transmitir el calor y la transición entre la temperatura a la que están mantenidos estos embriones y la temperatura del nitrógeno líquido. Este contenedor ha de estar muy bien cerrado, ya que si parte del nitrógeno líquido entra en contacto con los embriones puede causar la muerte de estos por daños físicos.

Estas pajuelas son iguales que las empleadas en inseminación artificial (0,25 o 0,5mL), a diferencia de que al montarla con el embrión, marcamos su localización en medio del líquido de congelación entre dos burbujas de aire, como nos muestra la *Figura 12*. Estas pajuelas deben ir identificadas según el manual de la IETS (Stringfellow y Givens; 2010). Algunos de estos datos son:

- Unidad de identificación básica.
- Fecha de congelación.
- Número de embriones.
- Información adicional de la donante y del toro.
- Número propio de la pajuela.

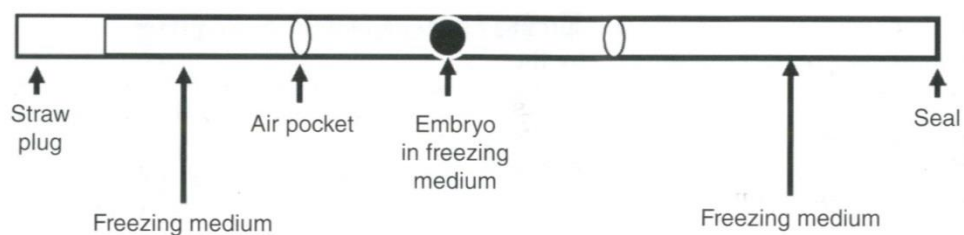


Figura 12. Dibujo esquemático que hace referencia a la colocación adecuada de los embriones dentro de las pajuelas de inseminación. Obtenido de Bondioli (2015).

3. Congelación. Cuando los embriones se encuentran encapsulados en las respectivas pajuelas, la temperatura se baja lentamente a una velocidad de 1-2°C/min. hasta alcanzar la temperatura objetivo, que ronda los -6°C. En este punto, el líquido de congelación

empieza a formar cristales de hielo sin dañar el embrión. Una vez se ha mantenido un tiempo la temperatura adecuada para que haya un intercambio osmótico entre el embrión y el líquido de congelación, se comienza a descender la temperatura de nuevo a una velocidad de 0,3-0,5°C/min hasta alcanzar los -35°C. Una vez aquí, la pajuela con el embrión congelado está lista para ser sumergida en nitrógeno líquido y ser conservada.

Para que el proceso de descongelación se pueda hacer de forma directa es necesario que la segunda fase de congelación también lo sea. Algunos estudios recomiendan esperar unos 30 seg. con la pajuela al aire antes de introducirlo al baño maría en agua caliente (35-37°C) para que, aunque sea un calentamiento rápido, no sea tan brusco como para provocar la formación de cristales y la consecuente lesión de la zona pelúcida (Robertson; 2015), ya que esto se produce cuando la temperatura se encuentra por debajo de -60°C y el calentamiento se hace de forma rápida.

Cuando se indica que la transferencia se puede realizar de forma directa se hace referencia a un método de descongelación caracterizado por ser muy similar a la descongelación de las dosis seminales utilizadas habitualmente. Se suele emplear una solución de EG a una concentración de 1,5Mol/L para una correcta conservación de los embriones (Robertson; 2015).

Vitrificación (revisado en Orlando y Sandra; 2012).

Actualmente, la técnica con la que se obtienen mejores resultados en cuanto a viabilidad del embrión tras la descongelación y colocación en la hembra donante es la vitrificación. Consiste en la solidificación del embrión mediante aplicación de frío de tal modo que no se producen cristales sino una sustancia no estructurada de aspecto vítreo.

Frente a la congelación lenta, la vitrificación presenta las siguientes características:

- Hay contacto directo entre los embriones y el nitrógeno líquido.
- El riesgo de cristalización del embrión es mínimo.
- Las altas concentraciones de crioprotector disminuyen el tiempo de exposición a estos.
- Es un proceso rápido. La velocidad de enfriamiento es de 10^7 °C/seg.
- El uso de pequeños volúmenes proveen un incremento significativo en la tasa de enfriamiento.
- Se minimizan los daños por frío debidos a cambios osmóticos.
- Se reduce el procedimiento de criopreservación entre 2-10 min respecto a la congelación lenta.
- Los protocolos son sencillos.
- No se necesita material específico, por lo que los costes no son tan elevados como en la congelación lenta.

El mayor riesgo a sufrir tanto por el rápido enfriamiento de los embriones como por los posibles daños causados por el crioprotector en este proceso es la formación de cristales en el citoplasma. Por esto, existen diferentes métodos para reducirlos, como (Arav; 2014):

- Menor tiempo de exposición a los crioprotectores.
- Uso de crioprotectores menos tóxicos o no penetrantes.
- Empleo de combinaciones de diferentes crioprotectores.
- Reducción de la concentración de crioprotectores en la disolución.
- Exposición a temperaturas menores para una mejor adaptación del embrión.

Una de las características principales de este proceso es el empleo de bajos volúmenes de crioprotector a concentraciones altas, lo cual evita considerablemente la posible formación de cristales de hielo intracelular. Para poder vitrificar embriones no hace falta material específico, pero existen varios protocolos dependiendo de los crioprotectores que se quieran emplear, para lo cual es importante conocerlos todos y adaptarlos a las condiciones de cada granja. Los pasos a seguir son:

1. Disposición del embrión en una solución de equilibrio. Antes de poder tomar contacto con la solución vitrificante, los embriones se colocan en un medio de mantenimiento, que suele ser un medio comercial denominado TCM-199 suplementado con bajas concentraciones de crioprotectores, como una combinación de 10% EG y 10% DMSO.

Los tiempos pueden variar entre 1,5 y 10 min, dependiendo del crioprotector empleado, las dosis y el incremento que se haga de estos para adaptarlos al siguiente paso. Se ha observado una relación directa entre el número de pasos para la adaptación en este proceso y la viabilidad del embrión tras la desvitrificación, ya que disminuye el estrés osmótico y el daño celular.

2. Introducción del embrión en la solución vitrificante. Aquí la solución vitrificante ya presenta mayores concentraciones de crioprotectores (20% EG + 20% DMSO), por lo que los tiempos de contacto con el embrión disminuyen para evitar la toxicidad (20-30 seg.).

A pesar de que no se quieren largos tiempos de exposición a los crioprotectores en altas concentraciones para evitar toxicidad, si no están el tiempo suficiente estos no podrán entrar en la célula para evitar la formación de cristales.

3. Introducción del embrión en el nitrógeno líquido. Para asegurar la protección del embrión en este proceso, se introducirá en una pajuela de igual modo que en la congelación lenta, por lo que también deberá llevar la misma identificación. Inicialmente la pajuela era idéntica a la del sistema anterior, pero se ha ido

abriendo y estirando para permitir un volumen menor de crioprotector y así conseguir una tasa de enfriamiento superior. Esto se consigue gracias a las pajuelas denominadas “Open Pulled Straw” (OPS) (Orlando y Sandra; 2012), donde el embrión queda cargado en unos 0,5-1µL de medio de mantenimiento.

Una vez aquí dentro y sin cerrar la pajuela, se introduce directamente en el nitrógeno líquido. Esto hace pensar que existe la posibilidad de contaminación de los embriones, por lo que se han diseñado diferentes sistemas cerrados como el “Cryoloop”, el “Cryotop” o la “Super Open Pulled Straw” (SOPS) (Orlando y Sandra; 2012).

Los procedimientos generales son similares en todos los protocolos de vitrificación, tan solo hace falta adaptar los crioprotectores y el sistema de empaquetamiento más adecuado. La *Tabla 3* muestra la relación entre las diferentes soluciones de vitrificación probados por Orlando y Sandra (2012), y la tasa de gestación correspondiente.

% Preñez	Embriones transferidos*	Evaluación <i>in vitro</i>		Solución de vitrificación	Sistema empaque	Fuente
		Re-expansión	Eclosión			
0%*	6	18,80%	--	40% EG + 0,3M SUC	Pajilla francesa 0,25mL	Palasz <i>et al.</i> 1997
4,50%	22	67%	53%	25% GLI + 25% EG	Pajilla francesa 0,25mL	Donnay <i>et al.</i> 1998
64%	22	--	--	20% EG +20% DMSO	Open Pulled Straws	Lewis <i>et al.</i> 1999
50%	40	71,60%	66,60%	25% EG + 25% GLI + 0,1 M SUC	Pajilla francesa 0,25mL	Martínez <i>et al.</i> 2002
30%	10	60%	54%	6,5M GLI	Pajilla francesa 0,25mL al	Nedambale <i>et al.</i> 2004
41,9%	481	91,8%	80,6%	35% EG + 5% PVP + 0,4 M TRE	Microgota sobre base metálica	Xu <i>et al.</i> 2006
19%	21	94,80%	75,80%	20% EG + 20% DMSO	Micropipeta de vidrio	Vieira <i>et al.</i> 2007
40%	30	100%	95,50%	16,5% EG+ 16,5 DMSO +0,5M SUC	Criotop	Inaba <i>et al.</i> 2011

Tabla 3. Comparación entre los diferentes métodos de vitrificación y las correspondientes tasas de gestación (EG: Etilenglicol, SUC: Sucrosa, GLI: Glicerol, TRE: Trealosa, DMSO: Dimetil-sulfóxido, PVP: polivinil-pirrolidona). Obtenido de Orlando y Sandra (2012).

Además del buen estado del embrión en el momento de la vitrificación, es muy importante asegurar la viabilidad de este tras la desvitrificación, por lo que el empleo de los crioprotectores adecuados es esencial.

Como describimos en el apartado de “congelación lenta”, la descongelación directa consiste en la inmersión de las pajuelas en un baño maría a 35-37°C, sin necesidad de tener material específico o pasar por complicadas diluciones. Esta última característica es el principal obstáculo para llevar la vitrificación de embriones al trabajo en el campo, ya que la descongelación en estos ha de hacerse de forma gradual en un medio isotónico, de modo que se va eliminando la concentración de crioprotectores poco a poco (Morató y Mogas; 2014). La solución tampón más empleada es la sucrosa, ya que su efecto osmótico previene la entrada de agua al interior del embrión. Una vez se ha diluido completamente el crioprotector, se restaura el aspecto adecuado del embrión en un baño con solución libre de sucrosa. Una dilución realizada en un solo paso con un medio a 0,5Mol/L de sucrosa es suficientemente efectiva para proteger al embrión de un shock osmótico durante la descongelación (Morató y Mogas; 2014).

La idea de un proceso de desvitrificación más rápido viene reforzado por estudios como el realizado por Caamaño *et al*, en 2014, donde se estudia la posibilidad de establecer un protocolo a base de soluciones de sucrosa para poder emplear los embriones vitrificados en la transferencia a nivel de campo.

3. Hembra receptora.

Se estima que debe haber unas 5 receptoras por donante (Görlach; 1997), ya que tras la superovulación y la inseminación artificial se van a obtener varios embriones viables. Si estos se van transferir en fresco es necesario que haya suficientes hembras para no desperdiciar embriones, aunque si se tienen los medios suficientes se pueden conservar bien

congelados o bien vitrificados, como ya hemos visto. Estas hembras deberán situarse con un margen de +/- 1 día del momento del ciclo estral en el que se encontraba la hembra donante en el momento de la recolección del embrión, ya que así se conseguirá una mayor aceptación de este por parte de la receptora.

En cuanto a las hembras receptoras, en muchas ocasiones no se toma con la suficiente seriedad el trato de estas, a pesar de cumplir un papel fundamental. Son las encargadas de mantener al embrión transferido hasta el nacimiento, por lo que además de necesitar unos cuidados nutricionales y ambientales, hemos de asegurar un estado sanitario adecuado, ya que “puede servir como centinela ante la presencia de cualquier agente infeccioso” (Stringfellow y Givens; 2010). Más detalladamente, las principales consideraciones a tener en cuenta en la hembra receptora son (Cliff y Mercadante; 2015):

- Ciclicidad, ya sea vaca o novilla.
- Nivel nutricional y condición corporal.
- Tamaño y conformación perineal.
- Buen historial reproductivo en animales lactantes.
- Buena boca, ojos y ubres.
- Ser menor de 8 años.

3.1. Condiciones sanitarias.

Con el objetivo de obtener unos buenos resultados en la recepción del embrión, se recomienda que la hembra receptora cumpla, como mínimo, los mismos requisitos sanitarios que la donante, establecidos en el Real Decreto 855/1992. En este documento se establecen las enfermedades obligatorias, pero para asegurar la buena viabilidad del embrión se recomienda que, además, el animal esté libre de paratuberculosis, diarrea vírica bovina (BVD), anaplasmosis y *Neospora* (Cliff y Mercadante; 2015).

3.2. Programas de sincronización.

La sincronización de las hembras receptoras debe estar muy controlada, ya que en el momento de la transferencia deben estar en el día adecuado para que la acogida del embrión sea lo más sencilla posible (+/- 1 día). Para esto, inicialmente se ha empleado la técnica citada en "Görlach (1997)", basada en la administración de una PGF en los días 6 y 17 del ciclo estral. En el año 2006, organizaciones como el equipo de FEFRIGA mostraron un sistema de sincronización para las receptoras que mantiene una buena relación entre trabajo, coste y resultados.

Esta técnica de sincronización consiste en la colocación de un dispositivo CIDR el día 0 junto a una GnRH, y una vez pasados 7 días se retira y se administra una PGF. Tras 48 h se da una GnRH y 7 días después el animal estará preparado para la transferencia del embrión, tras 16 días de sincronización (Figura 13).

GnRH	PGF	GnRH	Transferencia de embriones
CIDR	CIDR		
0	7	9	16

Figura 13. Esquema básico de presincronización de hembras para una transferencia de embriones empleando un dispositivo CIDR (GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas, CIDR: Dispositivo liberador de progesterona, PGF: Prostaglandina)

Lo importante de todos los protocolos de sincronización es buscar que la vaca receptora y la donante se encuentren en el mismo momento del ciclo estral, ya que la aceptación del embrión por parte de la receptora tan solo tiene lugar si la sincronización de esta no supera +/- 1 día a la donante.

3.3. Transferencia del embrión.

A fin de evitar problemas de fertilidad por un manejo inadecuado o forzado, se recomienda realizar una anestesia epidural en la hembra receptora si esta es muy nerviosa (Martínez *et al*; 2006). A la hora de

realizar la transferencia a la hembra receptora es muy importante ecografiar detalladamente los ovarios, ya que el embrión será depositado en el cuerpo ipsilateral al ovario donde encontremos un cuerpo lúteo.

Con la zona perineal lavada, se introducirá la vaina de inseminar con la pajuela que contiene el embrión deseado, y una vez pase el cérvix se llevará hasta el cuerno elegido para depositar la dosis en la curvatura anatómica que este realiza (Figura 14), asegurando que el orificio de salida no queda obstruido por la pared del cuerno.

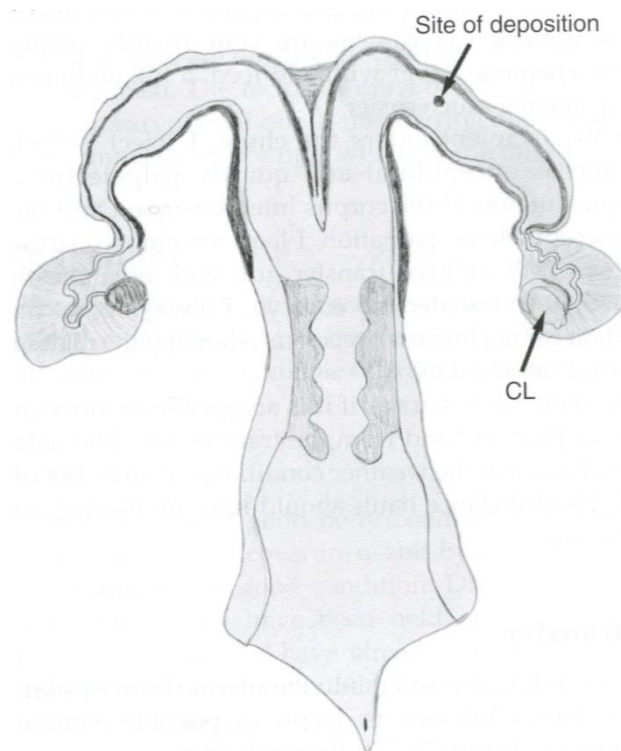


Figura 14. Localización del punto donde se ha de depositar el embrión en la hembra receptora. Obtenido de Robertson (2015).

4. Conclusión.

Tras la revisión bibliográfica detallada que se ha realizado, y debido a que uno de nuestros objetivos principales es determinar las metodologías aplicables a la transferencia de embriones a nivel de campo, podemos determinar que las mejores opciones son:

- Superovulación en la donante: Aunque el empleo de hormonas con actividad FSH (eCG o HMG) facilita el manejo en la granja por su administración única, diversos estudios han mostrado que las diferentes FSH que hay en el mercado aportan mejores resultados en la superovulación. Por lo tanto, el empleo de estas parece ser el más adecuado para una buena obtención de óvulos. Actualmente hay estudios preliminares que apoyan la idea de usar las FSH recombinantes para facilitar manejo con los animales, pero aun no se encuentra en el mercado.
- Sincronización de la receptora: Por comodidad tanto del trabajador como de manejo de la vaca receptora, la mejor opción parece ser el Presynch con empleo de CIDR.
- Recuperación de embriones: La solución comercial es muy cómoda de conservar y utilizar en los lavados, por lo que para la práctica en campo parece ser más útil que las soluciones de Ringer Lactato con BSA.
- Lavados de los embriones: Siempre valoraremos cuando es necesario un lavado con tripsina. El procedimiento a seguir será el establecido por la IETS, ya que ha demostrado ser eficaz frente a patógenos como *N. caninum* y diferentes tipos de virus.
- Conservación de los embriones: A vistas de futuro, vitrificar sería la mejor opción, pero aun no están disponibles las técnicas necesarias para evitar el largo proceso de descongelado, por lo que actualmente se sigue manteniendo la transferencia de embriones congelados, o en fresco si disponemos de los medios necesarios en la granja.

5. Bibliografía.

Libros y artículos:

- Alcivar AA, Maurer RR, Anderson LL. *Endocrine changes in beef heifers superovulated with Follicle-Stimulating Hormone (FSH-p) or Human Menopausal Gonadotropin (hMG)*. J. Anim. Sci. 1992; (70) 224-231.
- Arav A. *Cryopreservation of oocytes and embryos*. Theriogenology 2014; Vol 81. 96-102.
- Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauvé R. *Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of Neospora caninum in cattle*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2001; Vol 218 (11). 1803-1806.
- Bó GA, Mapletoft RJ. *Evaluation and classification of bovine embryos*. Anim. Reprod. 2013; Vol 10 (3). 344-348.
- Bó GA, Mapletoft RJ. *Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle*. Theriogenology 2014; Vol 81. 38-48.
- Bó GA, Mapletoft RJ. *Superovulation in cattle*. En: Bovine reproduction, 1ª ed. 2015. Sección III, capítulo 75 (696-702).
- Bondioli K. *Cryopreservation of bovine embryos*. En: Bovine reproduction, 1ª ed. 2015 Sección III, capítulo 77 (718-722).
- Caamaño JN, Gómez E, Trigal B, Muñoz M, Carrocera S, Martín D, Díez C. *Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure*. Theriogenology 2014; No publicado. Vol XXX (2015). 1-10.
- Carvalho PD, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Guenther JN, Souza AH, Fricke PM. *Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study*. Theriogenology 2014; Vol 82 (3). 481-489.

- Cliff G, Mercadante V. *Selection and management of the embryo recipient herd for embryo transfer*. En: Bovine reproduction, 1ª ed. 2015. Sección III, capítulo 78 (723-732).
- Görlach A. *Transferencia de embriones en ganado vacuno*. ACRIBA. 1997.
- Jahnke M, West J, Youngs C. *Evaluation of in vivo-derived bovine embryos*. En: Bovine reproduction, 1ª ed. 2015. Sección III, capítulo 79 (733-748).
- Kimura K, Matsuyama S. *Successful Nonsurgical Transfer of Bovine Elongating Conceptuses and its application to sexing*. Journal of Reproduction and Development 2014; Vol 60 (3).
- Martínez D, Álvarez J, Saavedra P, Fernández I. *Transferencia embrionaria en Galicia por la Unidad de U.T.E-BOS (FEFRIGA)*. Producción Animal 2006; Vol 217. 16-26.
- Mattos MC, Bastos MR, Guardieiro MM, Carvalho JO, Franco MM, Mourão GB, Barros CM, Sartori R. *Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors*. Anim. Reprod. Sci. 2011; Vol 125 (1-4). 119-123.
- Morató R, Mogas T. *New device of the vitrification and in-straw warming of in-vitro produced bovine embryos*. Cryobiology 2014; Vol 68. 288-293.
- Orlando R, Sandra B. *Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro*. Actualidad & Divulgación científica 2012; Vol 15 (2). 419-429.
- Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, Monniaux D. *Determination of Anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: From the laboratory to the farm*. Reprod. Fertil. Dev. 2012; Vol 24 (7). 932-944.
- Robertson E. *Embryo collection and transfer*. En: Bovine reproduction, 1ª ed. 2015. Sección III, capítulo 76 (703-717).

- Selk G. *Embryo Transfer in Cattle*. 2002. Oklahoma, Oklahoma State University.
- Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Verstegen JP, Shaver RD, Wiltbank MC. *Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows*. J. Dairy Sci. 2014. Vol 98. 169-178.
- Stringfellow DA, Givens, MD. *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)*. 2010; 4ª ed. Champaign, IL: IETS.
- Van Soom A, Wrathall AE, Herrler A, Nauwynck HJ. *Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection?*. Reprod. Fertil. Dev. 2010; Vol 22 (1). 21-31.
- Vernunft A, Schwerhoff M, Viergutz T, Diederich M, Kuwer A. *Anti-Müllerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes*. J. Reprod. Dev. 2015. Vol 61 (1). 74-79.

Páginas web:

- Bioniche Animal Health Inc. *Catálogo de productos de transferencia de embriones*. Belleville, Ontario (Canadá). Visitado el 10/05/2015.
- OIE. *Terrestrial Animal Health Code*, 23ª ed. Paris. 2014. Visitado el 18/04/2015.

Reales Decretos:

- Real Decreto 841/2011, del 17 de Junio de 2011.
- Real Decreto 855/1992, del 10 de Julio de 1992.

Índice de siglas:

SIGLAS	SIGNIFICADO
OIE	Organización Internacional de Epizootias
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
MOET	Múltiple Ovulación y Transferencia de Embriones
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
FSH-p	Hormona Folículo-Estimulante de origen porcino
FSH-o	Hormona Folículo-Estimulante de origen ovino
FSH-Rb	Hormona Folículo-Estimulante recombinante
CIDR	Dispositivo Liberador de Progesterona
BSA	Albúmina Sérica Bovina
IA	Inseminación Artificial
IETS	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
eCG	Gonadotropina Coriónica Equina
hMG	Gonadotropina Menopáusica Humana
hCG	Gonadotropina Coriónica Humana
DMSO	Dimetil-sulfóxido
PVP	Polivinil-Pirrolidona
MOPS	Ácido 3-N-Mofolino Propanosulfónico
HEPES	Ácido 4-2-Hidroxietil-1-Piperazina Tenosulfónico
TCM-199	Nombre comercial de una solución madre para el cultivo de embriones bovinos
OPS	Open Pulled Straw
SOPS	Super Open Pulled Straw
EG	Etilenglicol
SUC	Sucrosa
TRE	Trealosa
GLI	Glicerol