



## BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN OVINOS: PRODUCCIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Gibbons A. y Cueto M.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estación Experimental Agropecuaria Bariloche,  
Río Negro, Argentina - E-mail: gibbons.alejandro@inta.gob.ar

**NOTA:** A continuación se presenta la información resumida del Manual de transferencia de embriones ovinos y caprinos (segunda edición, 2013). INTA EEA Bariloche.

**Palabras claves:** inseminación artificial, transferencia de embriones, vitrificación de embriones.

### INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es un método de reproducción asistida basado en la producción de múltiples embriones, por una hembra donante (madre genética superior) y transferidos antes de la edad de implantación, en varias hembras receptoras (madres portadoras gestantes).

Los tratamientos hormonales para lograr una ovulación múltiple (OM) y la TE permiten utilizar intensivamente a las hembras genéticamente superiores. En conjunto ambas tecnologías son denominadas internacionalmente con las siglas en inglés "MOET" ("multiple ovulation and embryo transfer"). En los últimos 25 años se han logrado considerables avances en la MOET, como herramienta del mejoramiento genético en ovinos y caprinos, siendo aún necesario maximizar la producción y sobrevivencia de embriones para obtener varias crías de valor genético. Cabe consignar que una hembra podrá formar parte de un programa de transferencia en más de una oportunidad, de manera que es posible multiplicar su potencial reproductivo, al utilizarse ovejas de escaso valor genético como receptoras de embriones genéticamente superiores (Mueller 1993).

El potencial natural reproductivo de cada especie y de cada raza es una limitante a la rapidez de difusión del progreso genético. En las condiciones tradicionales de cría ovina y caprina, el número de descendientes producidos por hembra y por año es de una o dos crías, por lo tanto durante su vida reproductiva se logran obtener entre 6 a 8 crías. La TE permite incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la gran reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario. La estimulación hormonal de los ovarios desencadena la OM pudiéndose obtener un número considerable de embriones en un corto período de tiempo.

La finalidad de la aplicación de esta biotecnología tiene fundamentos de orden genético, comercial, sanitario y de conservación de las especies, posibilitan acortar el intervalo generacional y en consecuencia incrementar el avance genético. A su vez, conjuntamente con la inseminación artificial, son excelentes herramientas para el mejoramiento genético de majadas y hatos que se encuentren aislados de los proveedores de reproductores. A nivel internacional, la comercialización de embriones congelados de ovinos ha permitido una amplia difusión mundial de germoplasma, con un muy bajo riesgo sanitario y posibilitando mejorar rápidamente el nivel genético de las diversas razas. También ha sido posible establecer nuevos sistemas alternativos de producción en carne, leche, lana, pelo en ovinos y caprinos.

### Principios y consideraciones generales sobre la transferencia de embriones

La elección de las hembras donantes se realizará teniendo en cuenta su valor genético y en base a los criterios apropiados de mejoramiento de las aptitudes productivas para cada raza.

Las condiciones generales de un buen estado reproductivo, sanitario y nutricional son imprescindibles, tanto para las hembras donantes como para las receptoras de embriones. Se debe realizar el control clínico de los animales, los análisis serológicos de enfermedades infecto contagiosas y los controles parasitarios correspondientes.

Es recomendable que las donantes y receptoras hayan tenido al menos una cría, y se debe considerar un mínimo de 2 meses post parto antes de comenzar los tratamientos hormonales. Acortar estos tiempos puede significar una baja en la eficiencia productiva de embriones y en su posterior viabilidad.

La necesidad de utilizar hembras jóvenes como



donantes puede llevar a una baja eficiencia reproductiva. En el supuesto caso de tratar una hembra nulípara, el peso mínimo deberá ser del 75% del peso adulto de la raza y haber presentado estros anteriormente.

Se recomienda no usar borregas como madres receptoras. Lo indicado son las hembras adultas, que puedan llevar a cabo la gestación sin comprometer su crecimiento y contribuir al desarrollo de la cría por medio de una buena lactancia.

Los programas de TE requieren un manejo intensivo de las donantes y receptoras. En el caso de recurrir a instalaciones extrañas, es preferible que los animales tengan un período de adaptación previo, de uno a dos meses, antes de comenzar los tratamientos hormonales. La identificación con caravanas con números visibles a la distancia, permite realizar los manejos necesarios sin cometer equivocaciones y sin provocar stress, que puede perjudicar los resultados. A su vez, se deben considerar los aspectos sanitarios, nutricionales y reproductivos de los machos, así como su calidad seminal, ya sea que se utilicen en servicio natural o mediante la inseminación artificial con semen fresco, refrigerado o congelado.

**Previo a la realización de un programa de TE, se deberán considerar los siguientes puntos:**

### **1- Estimulación ovárica para la ovulación múltiple**

La OM ha sido inducida en la especie ovina y caprina mediante la administración de 1000 a 1200 UI de eCG (equine Chorionic Gonadotrophin), 48 horas antes de finalizar el tratamiento progestacional. Los tratamientos con eCG han dado resultados inferiores a los obtenidos mediante FSH, debido a que por su elevado peso molecular, tiene una vida media larga (21 horas) y provoca un crecimiento folicular disperso, induce la formación de folículos anaovulatorios, luteinización folicular prematura y reduce la fertilidad, recuperación y calidad embrionaria (Armstrong y Evans 1983, Armstrong y col. 1983, Moore y col. 1985, Tsunoda y Sugie 1989, Walker y col. 1989).

El tratamiento más aceptado para provocar la OM en ovinos y caprinos es mediante la aplicación de dosis decrecientes de FSH hacia el final del tratamiento progestacional. A diferencia de la eCG, la FSH presenta una vida biológica corta (3 a 4 horas), por lo que es necesaria su administración repartida en 6-8 aplicaciones cada 12 horas. La OM se presenta alrededor de las 60 horas post retiro de la esponjas

con progestágenos (PREP) (Foto 1) (Walker y col. 1986).

La FSH puede expresarse en mg de NIH-FSH-P1, recomendándose dosis totales de hasta 200 mg por hembra donante. El "tratamiento tradicional" que más hemos utilizado en ovinos de la raza Merino, durante la época otoñal, combina dosis decrecientes de FSH con una aplicación única de eCG hacia el final del tratamiento progestacional. Consiste en la colocación de esponjas intravaginales con progestágenos (60 mg de acetato de medroxiprogesterona, Progespon®, Syntex, Argentina) durante 14 días y la administración de 200 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V®, Bioniche, Canadá) por oveja tratada, suministrados en 6 aplicaciones en forma decreciente de la siguiente manera: 50, 50, 30, 30, 20 y 20 mg de pFSH a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja intravaginal y administración de 200 UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex, Argentina).

En la raza Merino y durante la estación reproductiva, hemos comprobado que es posible reducir la dosis total de FSH por oveja donante a 80 mg totales de NIH-FSH-P1, distribuidos en 6 aplicaciones de 18, 18, 14, 14, 8 y 8 mg, a partir del día 12 post colocación de esponja intravaginal. La quinta aplicación se realiza en coincidencia con el retiro de la esponja intravaginal y administración de 200 UI de eCG (Novormon 5000®, Syntex, Argentina) (Figura 1, ver Punto 4). De esta manera, si bien mediante el tratamiento de baja dosis se observó una menor tasa de ovulación ( $P < 0.05$ ), el número de embriones y la calidad embrionaria fue semejante, debido probablemente a la obtención de una mayor tasa de recuperación embrionaria y una mayor tasa de fertilización ( $P > 0.05$ ) (Gibbons y col. 2010) (Tabla 1).

La presentación del celo post tratamiento con FSH (80 mg) es variable; sin embargo es habitual observar celo en las donantes entre las 24 a 48 horas PREP. También es posible obtener mediante este tratamiento más del 80% de las ovejas donantes en celo a las 36 horas PREP. La reducción del alto costo de la FSH a casi un tercio, brinda una ventaja económica para su utilización en los programas comerciales de TE.



**Tabla 1.** Eficiencia de la recuperación embrionaria mediante 80 mg (Baja dosis) o 200 mg (Dosis alta) de pFSH (NIH Folltropin-V®) + 200 UI de eCG (Novormon 5000®) en ovejas Merino durante la estación reproductiva.

	Baja dosis	Dosis alta
Animales (n)	43	11
Tasa de ovulación ( $\bar{x}$ )	13,0±0,9 a	17,5±1,8 b
Estructuras ováricas recuperadas* ( $\bar{x}$ )	7,4±0,7 a	10,0±1,4 a
Tasa de estructuras ováricas recuperadas (%)	59,6±3,6 a	56,3±7,1 a
Embriones recuperados ( $\bar{x}$ )	5,9±0,6 a	6,4±1,2 a
Tasa de embriones recuperados (%)	50,0±4,0 a	38,6±7,9 a
Embriones recuperados Grados 1 y 2** ( $\bar{x}$ )	5,0±0,6 a	5,5±1,2 a
Tasa de embriones recuperados Grado 1 y 2 (%)	85,0±3,8 a	82,6±7,2 a
Ovocitos no fertilizados ( $\bar{x}$ )	1,0±0,5 a	2,6±1,0 a
Tasa de no fertilización (%)	9,7±4,3 a	25,1±8,4 a
Tasa de respuesta ( $\leq 3$ CL) (%)	98,0 a	100,0 a

a, b indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ )

\* Embriones + ovocitos + zonas pelúcidas

\*\* Ver Anexo 1. Grados de Clasificación de embriones

En otra experiencia hemos evaluado la eficiencia de dos tratamiento de OM (múltiples dosis de FSH vs una dosis de FSH) sobre los rendimientos de embriones en ovejas Merino, en estación reproductiva (otoño) y no reproductiva (primavera). En resumen, se evidenció que el tratamiento multidosis produjo una mayor respuesta multiovulatoria y un número mayor de embriones viables en ambas épocas del año (Cueto y col. 2011).

En la actualidad se han evaluado tratamientos multiovulatorios tendientes a no utilizar progestágenos en ovinos. Mayorga y col. (2011) y Quan y col. (2011) consideran que es posible obtener un buen número de embriones transferibles realizando los tratamientos de OM con FSH, y con la utilización de prostaglandinas. Recientemente Gharbi y col. (2012) determinaron el efecto de un tratamiento previo con agonista de GnRH (buserelina) sobre el estado ovárico folicular, la respuesta a la inducción de la OM y la producción de embriones. La respuesta ovulatoria y el número de embriones transferibles en las ovejas tratadas fue significativamente mayor con respecto a las ovejas control (respuesta ovulatoria: 17,8±1,56 vs 9,1±1,11,  $P < 0,001$ ) (embriones transferibles: 10,2±1,87 vs 4,1±0,40,  $P < 0,01$ ). A su vez, en el grupo tratado con GnRH, se obtuvo un menor porcentaje de embriones degenerados (Tratadas: 7,27 vs Control: 20,40%,  $P < 0,05$ ).

Una mayor eficiencia en la OM se logra cuando se utiliza FSH de origen porcino u ovino (Alberio y col. 1993). En contraste con la eCG, el empleo de la FSH determina una mejor migración espermática (Evans y Armstrong 1984), mayor tasa de fertilización cuando se emplea la inseminación artificial (Evans y col. 1984) y una mayor producción de embriones (Armstrong y col. 1983, Torres y col. 1987). Simoneti y col. (2008)

evalúan la viabilidad de emplear FSH ovina en los tratamientos superovulatorios en ovejas Corriedale. Por su parte Agaoglu y col. (2012) investigaron el efecto de la estimulación con FSH ovina (Ovagen®) respecto a la FSH porcina (Folltropin®) sobre la respuesta superovulatoria y la calidad embrionaria en ovinos, concluyendo que la oFSH fue más eficaz que la pFSH únicamente en calidad de los embriones.

Otros tratamientos de OM están disponibles en la literatura, Menchaca y col. (2009) evalúan la información de los diversos tratamientos farmacológicos y obtienen una mejora significativa en el número de embriones transferibles por donante tratada. A su vez, Menchaca y col. (2010) revisan los conocimientos en la OM y la transferencia de embriones para los pequeños rumiantes, centrándose en la información reciente. También examinan la situación de las técnicas de reproducción asistida en el ganado ovino, analizando las perspectivas que ofrecen los últimos avances en la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.

En algunas donantes se puede presentar una *regresión temprana del cuerpo lúteo* en los primeros 6 días post ovulación, afectando la recuperación y la calidad embrionaria, siendo posible prevenirla mediante el uso de inhibidores de la prostaglandina (Traldi y col. 1995), aplicando Meglumina Flunixinina. Un tratamiento clásico consiste en comenzar con una dosis de 1,1 mg/kg/día de Flunixinina Meglumina (Banamine®, Schering Plough, Veterinaria), a las 72 horas de retirados los progestágenos, durante tres días consecutivos. También es posible aplicar un progestágeno intravaginal a las 24 horas post celo (Melican y Gavin 2008).

**Nota:** Consideramos que siempre será muy importante determinar y ajustar las dosis de los tratamientos hormonales en base al número de embriones transferibles por donante, considerando varios factores que se detallan a continuación.

## 2- Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple

La respuesta hormonal de OM está condicionada por factores intrínsecos (variabilidad individual, dinámica folicular) y extrínsecos (raza, estación sexual, alimentación, edad).

La **variabilidad individual** de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de OM. Estudios realizados en vacunos demostraron que solamente el 68% de las hembras respondió con embriones transferibles. El 32% restante incluía



a las hembras sin respuesta a la estimulación ovárica, sin recuperación de embriones u ovocitos, o con recuperación de embriones no transferibles (Donaldson 1984). Cordeiro y col. (2003) observaron que las mismas ovejas que no superovularon en respuesta al primer tratamiento hormonal con FSH, tampoco respondieron al segundo tratamiento multiovulatorio. Por consiguiente siempre se debe tener presente que un porcentaje de hembras puede no responder al tratamiento hormonal de OM, debiéndose considerar la posibilidad de incrementar el número de donantes. Se ha sugerido que un bloqueo gonadotropo mediante un tratamiento prolongado con antagonista de la GnRH (10 a 14 días), previo a la aplicación de FSH, posibilita incrementar el número y concentrar las ovulaciones, y duplicar el número de corderos nacidos por donante con una alta *repetibilidad individual* (Cognie 1999, Cognie y col. 2003). La administración endovenosa de 3 mg de LH a las 32-36 horas de finalizado el tratamiento progestacional, posibilita sincronizar la ovulación entre las 20-28 horas post aplicación, permitiendo realizar la inseminación artificial a tiempo fijo a las 48-50 horas PREP (Cognie y col. 2003). En Francia, se ha empleado este tratamiento con resultados promisorios lográndose un mayor número de ovejas multiovuladas (>5 ovulaciones), con más de 10 embriones transferibles por oveja donante en la raza Lacaune. Sin embargo, una elevada respuesta ovulatoria (>30 cuerpos lúteos por oveja), se ha asociado con una menor tasa de fertilización y embriones transferibles. Si bien con este tratamiento se ha logrado una mayor repetibilidad individual en la tasa de ovulación entre dos tratamientos sucesivos de OM, aún se mantiene una elevada variabilidad entre individuos. En base a un reciente ensayo (Bruno Galarraga y col. 2011a), en el cual se evaluó la respuesta multiovulatoria de ovejas (n= 31) tratadas con 800 UI de eCG, y posteriormente, con 80 mg de FSH, hemos determinado por observación laparoscópica que el 84% de las ovejas que respondió con una alta o baja tasa ovulatoria al primer tratamiento con eCG, conservó su clasificación como donante de alta o baja en respuesta al tratamiento con FSH (tasa de recurrencia). La elevada tasa de recurrencia de la respuesta ovulatoria permite concluir que la selección de las ovejas donantes por su primo respuesta a un tratamiento de OM, brinda la posibilidad de obtener un mayor número de embriones por donante y reduce los costos operativos en la implementación de un programa de OM con TE. Como alternativa a la evaluación laparoscópica de la respuesta ovárica, se presenta la posibilidad de determinar la concentración sanguínea de progesterona 1 día antes de la recolección de

embriones, lo que permite la identificación de las ovejas donantes que no responden o responden con una baja tasa de ovulación, así como la identificación de animales con una buena respuesta ovulatoria (>9 CL) (Amiridis y col. 2002).

La respuesta ovulatoria a los tratamientos hormonales ha sido estudiada en base a la *dinámica folicular* en los ovarios y está positivamente correlacionada con el número de folículos chicos (2 a 3 mm de diámetro) al momento de la primera aplicación de FSH, la cantidad de folículos medianos (4-5 mm) al momento de finalizado el tratamiento progestacional y el número de folículos grandes (>6 mm) al momento del estro (González-Bulnes y col. 2000). Sin embargo, en la raza Merino, nosotros no encontramos una relación significativa entre el número de cuerpos lúteos y el número de folículos chicos o totales al inicio del tratamiento de OM. Si bien se evidenció una relación significativa entre el número de folículos grandes y la respuesta multiovulatoria al tratamiento con FSH ( $P<0.05$ ), su coeficiente de determinación ( $R^2=0.13$ ) indicaría que la relación existente entre estas variables es baja (Bruno Galarraga y col. 2011a). En la actualidad existen varios factores no bien esclarecidos, que controlan la foliculogénesis, el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la ovulación múltiple y la fertilización. Los avances que se logren en el entendimiento de sus funciones y sus interrelaciones, determinarán una mayor eficiencia de los tratamientos hormonales de OM, reduciendo los costos e incrementando los beneficios de la transferencia de embriones.

La *raza* es un importante factor extrínseco de variación, presentándose en las ovejas más prolíficas una mayor respuesta a la OM, embriones transferibles y crías nacidas (Tervit 1986, Ritar y col. 1988, Baril y col. 1989).

La *estación sexual* también influye sobre el número medio de ovulaciones por hembra ovina, siendo superior en la estación reproductiva respecto al período de anestro (Torres y col. 1984, Cueto y col. 2011). Nuestros resultados indican que durante el anestro estacional, cuando se aplican tratamientos múltiples con FSH en ovejas Merino, disminuye el número promedio de embriones recuperados y se presenta una menor tasa de fertilización, si bien no se afecta el número medio de embriones de buena calidad (Cueto y col. 2011).

La *alimentación* deficiente juega un rol fundamental en la respuesta a los tratamientos de OM, debido a que se ha demostrado que no solamente afecta



la respuesta ovulatoria sino que es posible que se presenten luteólisis prematuras, tanto en estación como en contraestación sexual (Baril y col. 1989, Jabbour y col. 1991). Consecuentemente la recuperación embrionaria es baja (Armstrong y col. 1982, Tervit 1986). En cabras, la aparición de este fenómeno es muy variable (0 a 27%). Este problema también ha sido reportado en ovinos (Trounson y Moore 1974, Jabbour y col. 1991) y está muy condicionado a factores de estrés en las donantes.

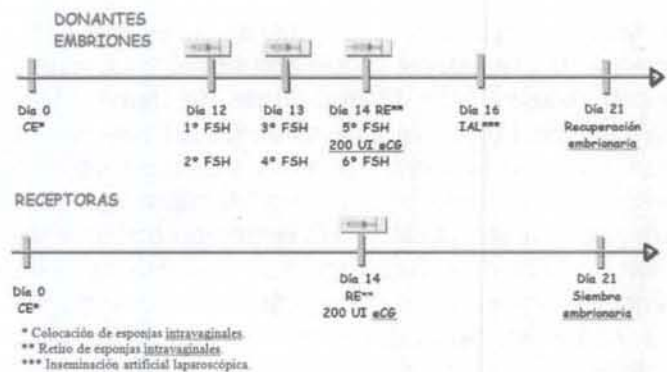
Respecto a la **edad de las donantes**, Bari y col. (2000) concluyen que mientras las ovejas adultas tienen una mayor tasa de ovulación y producción de embriones, en las borregas se presenta una mayor proporción de embriones de alta calidad. A su vez, el número de partos y la edad de las donantes son determinantes en la eficiencia de la OM (Lehloeny y Greyling 2010).

### 3 - Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro entre donante y receptora

La sincronización de los estros de las receptoras mediante tratamiento progestacional se realiza en forma conjunta con las hembras donantes. En general se debe disponer de 5 a 6 receptoras por cada oveja donante. El objetivo es lograr que donantes y receptoras presenten sus estros el mismo día o con un desfase de 12 horas (Shelton y Moore 1966).

Los análogos sintéticos de la progesterona, el FGA (acetato de fluorogestona) y el MAP (acetato de medroxiprogesterona), son comúnmente empleados en pesarios (esponjas intravaginales) para los tratamientos de sincronización de celos. Se pueden aplicar durante 14 días en el ovino. En Australia y Nueva Zelanda es muy frecuente la utilización de progesterona vía vaginal, empleando el CIDR (Control Interno de Liberación de Droga).

La eCG se utiliza al final de los tratamientos con esponjas intravaginales con progestágenos para la sincronización de celos. En los ovinos y caprinos, se recomienda la colocación de una esponja intravaginal y la administración de eCG al momento de su retiro (Figura 1). La dosis de eCG varía según especie, raza y estado fisiológico reproductivo (valores indicativos por hembra: 200 a 400 UI).



**Figura 1.** Cronograma de tratamiento hormonal para la ovulación múltiple en ovejas Merino donantes y receptoras de embriones.

### 4 - Fecundación de la hembra donante

La fecundación en las hembras donantes puede realizarse mediante servicio natural a corral o mediante inseminación artificial (IA), con semen fresco o congelado. El servicio a corral se realiza cada 12 horas, desde el comienzo del celo y hasta su finalización. Otros autores recomiendan realizar el servicio cada 6 horas (Ishwar y Memon 1996).

La inseminación cervical en ovejas se considera poco eficiente para los programas de OM. La utilización de la laparoscopia para la deposición de semen intrauterino es una técnica que brinda aceptables tasas de fertilización en las donantes superovuladas cuando se utiliza semen fresco o congelado-descongelado y a su vez, permite aumentar las tasas de fertilización, así como reducir las dosis de inseminación. Bari y col. (2000) compararon dos sistemas de fertilización (servicio natural más IA intrauterina por laparoscopia con semen fresco vs monta natural), determinando que la IA no afecta la tasa de recuperación embrionaria y se mejora la tasa de fertilización y la calidad y sobrevivencia embrionaria.

#### - Dosis de inseminación

Las siguientes son dosis de inseminación de referencia para la IA con *semen fresco* (en millones de espermatozoides): IA cervical: 800 (ovinos) - IA laparoscópica: 80 (ovinos) Brebion y col. 1992).

La dosis seminal empleada en la IA laparoscópica con *semen congelado* en ovinos (Wolff y col. 1994) es de 100 millones de espermatozoides.

La fertilidad de la IA en las hembras multiovoladas es menor respecto a la inseminación de animales testigo no tratados (Moore y Epplston 1979, Armstrong y Evans 1984). A su vez, la tasa de fecundación no se puede incrementar por medio de



un mayor número de inseminaciones o elevando la concentración espermática de la dosis inseminante (Vallet y col. 1991, Brebion y col. 1992). La eficiencia de la fertilización en las hembras multiovuladas ha presentado resultados muy variables en función de la técnica de fertilización empleada, el momento de inseminación (con detección de celos o a tiempo fijo, IATF) y la respuesta multiovulatoria al tratamiento hormonal. Se debe tener en cuenta que mediante el servicio natural o IA por vía vaginal en las ovejas donantes de alta respuesta ovulatoria (más de 10 a 12 ovulaciones) se puede obtener una baja tasa de fertilidad, debido a la reducción del transporte espermático en el tracto reproductivo (Cognie 2003).

En ovejas de raza Lacaune, mediante IA vía vaginal con **semén fresco** a las 48 y 60 horas PREP, se han obtenidos tasas de fecundación entre el 61 al 78% (Brebion P. sin publicar citado por Baril y col. 1993), en tanto que en la misma especie, Armstrong y Evans (1984) obtuvieron una fertilidad del 82%. En el caso de utilizar el semen fresco por IA laparoscópica (IAL), en ovinos se recomienda realizar la IA entre las 24 a 28 horas post celo, lográndose porcentajes de fertilización entre el 81 y 82% (Lymberopoulos y col. 2001). Bari y col. (2001, 2003) recomiendan realizar la IAL entre las 44 a 46 horas PREP. Si se utiliza **semén congelado** para la IATF por laparoscopia, es conveniente realizar la IA a las 44h (ovinos) PREP.

Los programas de inseminación IATF por laparoscopia con semen congelado para los tratamientos de OM son muy riesgosos y sólo deben ser utilizados cuando se conoce la distribución de celos de la población en particular, para un régimen hormonal y para la estación sexual en la cual se desea trabajar. La eficiencia de fertilización con el empleo de semen congelado a tiempo fijo ha presentado resultados variables. Si bien Armstrong y Evans (1984) obtuvieron una fertilidad del 50%, en nuestra experiencia, la utilización de GnRH ha permitido obtener un porcentaje mayor de fertilización. Mediante la administración de un análogo de la GnRH (8 µg de Busereleina; Receptal®), 36 horas PREP, obtuvimos tasas de fertilización del 70-80% al realizar la IA con semen congelado, indistintamente a las 42 o 55 horas PREP (Wolff y col. 1994).

Sin embargo, se recomienda inicialmente realizar la inseminación laparoscópica luego de detectado el celo. En nuestra experiencia, en la raza Merino, realizamos la IA con semen congelado sobre celo detectado y con una dosis de 100 millones de espermatozoides totales. Las ovejas detectadas en celo a las 24 horas PREP se inseminan 24 post

celo y las que presentan celo a las 36 o 48 horas se inseminan a las 12 horas de detectadas en estro, obteniendo un porcentaje de fertilización de 78.6%.

## 5 - Colecta de embriones

En ovejas, la colecta embrionaria se realiza en los días 7<sup>mo</sup> u 8<sup>vo</sup> PREP.

Las colectas embrionarias se realizan en los días mencionados debido a los siguientes fundamentos: - Los embriones están en el tercio superior de los cuernos uterinos. - Presentan la membrana pelúcida, necesaria como barrera sanitaria. - La congelación se realiza en estado de mórula compacta o blastocisto.

Las técnicas para la colecta de embriones en los rumiantes menores se llevan a cabo bajo anestesia general. Es indispensable que los animales no reciban alimento ni agua en las 24 horas previas a la operación. En ovinos, se puede utilizar un tranquilizante intramuscular (2 mg/10 kg, Xilazina 2%) y un anestésico endovenoso (50 mg/10 kg, Thiopental sódico). También es posible realizar una combinación de Xilazina (2 mg/10 kg, Xilazina 2%) y Ketamina (1.1 mg/10 kg, Clorhidrato de Ketamina), administrados ambos en forma intramuscular (Xilazina: 0.2 ml, Ketamina: 3 ml, respectivamente). Asimismo se puede aplicar un anestésico local en el área quirúrgica (1 ml, Lidocaína 2%). En el caprino, cuando se administra Ketamina, es recomendable ajustar la dosis según los signos de profundización de la anestesia.

A continuación se detallan las técnicas de recolección de embriones en ovinos y caprinos:

### 5 a) Técnica quirúrgica

La hembra se ubica en un plano inclinado en una camilla (cabeza hacia abajo). Se rasura y se desinfecta el campo operatorio. Se realiza una laparotomía media de 5 a 7 cm, y a 3 cm por delante de la ubre. Antes de comenzar con la recuperación embrionaria, se realiza la determinación de la respuesta ovulatoria (recuento del número de cuerpos lúteos, CL), mediante exteriorización de los ovarios o por observación laparoscópica. En base al número de estructuras colectadas se determina el porcentaje de recuperación embrionaria. La recuperación embrionaria consiste en la colocación de una sonda (K33) que en su extremo dispone de una aguja (50/20) con punta no traumática y dos perforaciones laterales y una central. Se realiza una punción en la unión útero tubárica y se enhebra la sonda en el interior de la luz del cuerno uterino (1 cm), fijando



la misma por medio de un clamp vascular o ligadura. Aproximadamente a un par de cm de la bifurcación de los cuernos uterinos, se realiza una segunda punción, para la inyección de 20 ml de PBS a 38 °C. De esta manera se produce una corriente de arrastre que fluye hacia la unión útero tubárica, donde está ubicada la sonda, y el medio de colecta es recuperado en un Erlenmeyer estéril previamente entibiado. Se procede de igual manera con el otro cuerno uterino. Finalizada la recuperación embrionaria, se realiza la sutura de los planos quirúrgicos y se administran antibióticos. También es posible ubicar una sonda de Foley en la bifurcación de los cuernos uterinos, recuperando el líquido de colecta por la misma sonda. El medio recuperado es volcado en cajas de Petri cuadradas para proceder a la búsqueda de embriones bajo lupa (10X). Mediante la recuperación quirúrgica de embriones se obtienen tasas medias de recolección superiores a las reportadas mediante los procedimientos no quirúrgicos (tasa media de recolección, 50-60%). Sin embargo, la tasa de recuperación embrionaria decrece significativamente con las sucesivas intervenciones quirúrgicas, como consecuencia de la formación de adherencias. Torres y Sevellec (1987) evaluaron la eficiencia de tres recuperaciones quirúrgicas embrionarias sucesivas en ovinos, obteniendo los siguientes valores: 88, 52 y 24% para la primera, segunda y tercer intervención, respectivamente. En nuestra experiencia y en coincidencia con estos resultados, la tasa de recuperación embrionaria disminuyó en la segunda y tercera intervención (41.4 y 34.5%, respectivamente) en comparación con la primera (66.1%) ( $P < 0.05$ ) (Cueto y col. 2010). Aún así, la recuperación quirúrgica embrionaria mediante tres tratamientos sucesivos de OM nos permitió obtener un valor medio de 18.5 embriones por oveja donante en un período de 2.5 meses. En la Tabla 2, se presentan las variables productivas registradas en las sucesivas recuperaciones embrionarias.

**Tabla 2.** Eficiencia productiva de embriones en ovejas Merino tratadas con 80 mg de pFSH + 200 UI de eCG en tres recuperaciones quirúrgicas embrionarias sucesivas.

	Recuperaciones embrionarias		
	Primera	Segunda	Tercera
Cuerpos lúteos ( $\pm$ SEM)	13.8 $\pm$ 2.2 a	12.1 $\pm$ 2.2 a	12.0 $\pm$ 2.2 a
Embriones totales ( $\pm$ SEM)	8.3 $\pm$ 1.4 a	6.3 $\pm$ 1.4 ab	3.9 $\pm$ 1.4 b
Embriones Grados 1-2* ( $\pm$ SEM)	7.4 $\pm$ 1.3 a	5.7 $\pm$ 1.3 ab	3.2 $\pm$ 1.3 b
Recuperación de embriones totales (%)	66.1 $\pm$ 7.5 a	41.4 $\pm$ 7.5 b	34.5 $\pm$ 7.9 b
Recuperación de embriones Grados 1-2 (%)	84.8 $\pm$ 8.4 a	89.5 $\pm$ 9.4 a	67.4 $\pm$ 8.9 a
Tasa de fertilización (%)	100 $\pm$ 5.6 a	95.8 $\pm$ 6.3 a	85.3 $\pm$ 6.0 a

Valores con diferente letra presentan diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ )

\* Grados de calidad embrionaria 1-4, IETS 1998

En base a la información obtenida en la experiencia anterior, se compararon las ovejas que presentaron

una baja respuesta al primer tratamiento multiovulatorio (Grupo BR,  $\leq 14$  CL) respecto a las que tuvieron una alta respuesta ovulatoria (Grupo AR,  $> 14$  CL). Los resultados se presentan en la Tabla 3. Al considerarse la suma de los tres tratamientos sucesivos, el grupo AR duplicó el total de embriones recuperados y transferibles por oveja donante (24.0 y 21.6 respectivamente), en comparación con el grupo BR (13.0 y 11.0, respectivamente).

**Tabla 3.** Efecto de tres tratamientos hormonales sucesivos sobre la respuesta ovulatoria y la producción de embriones en ovejas de la raza Merino (recuperaciones quirúrgicas).

Respuesta ovulatoria	Tratamientos hormonales sucesivos								
	Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3		
	CL	E	ET	CL	E	ET	CL	E	ET
Baja ( $\bar{X} \pm$ SEM)	8.4 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	6.4 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	5.6 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	8.0 $\pm$ 2.4 <sup>ab</sup>	4.2 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	3.6 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	7.8 $\pm$ 3.0 <sup>ab</sup>	2.4 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	1.9 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>
Alta ( $\bar{X} \pm$ SEM)	19.2 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	10.2 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	9.2 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	16.2 $\pm$ 2.4 <sup>ab</sup>	8.4 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	7.8 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	16.2 $\pm$ 3.0 <sup>ab</sup>	5.4 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	4.6 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>

Letras diferentes dentro de una misma columna (a, b) o dentro de una misma fila (A, B) indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre ovejas con alta y baja respuesta ovulatoria y entre tratamientos multiovulatorios en un mismo grupo de ovejas, respectivamente

CL: Cuerpo lúteo. E: Número de embriones recuperados por oveja donante. ET: Número de embriones transferibles por oveja donante (Grados 1 y 2; IETS 1998)

La repetibilidad de la respuesta ovulatoria al tratamiento de OM presentó un valor de 0.84 ( $P < 0.05$ ). Por consiguiente, la selección de las donantes según su respuesta ovárica al primer tratamiento multiovulatorio, sería un buen método para reiterar el tratamiento hormonal solamente en las hembras que dieron una mayor producción de embriones en su primera recuperación (Bruno Galarraga y col. 2011b).

### 5b- Técnicas no quirúrgicas

Recientemente, Gusmão y col. (2009) desarrollaron una novedosa técnica de **recuperación transcervical de embriones**, a partir de un estudio que permitió la expansión del cuello uterino en ovejas Dorper mediante la aplicación intravaginal de un análogo sintético de prostaglandina E1 (PGE1). Esta técnica permitió obtener una media de 6.0 ( $\pm 3.6$ ) embriones por donante. Gusmão (2011) presenta una interesante revisión sobre esta novedosa tecnología de recuperación transcervical de embriones. El tiempo medio para realizar una recuperación de embriones quirúrgica es de aproximadamente 15 a 20 minutos, y 30 minutos por recuperación transcervical.



Independientemente de la técnica de recuperación embrionaria utilizada, y si se desea contar con la seguridad de que las hembras donantes no queden preñadas por embriones no recuperados, se recomienda la administración de prostaglandinas PF2 alfa al final de las intervenciones (125 µg de Cloprostenol/donante).

## 6- Siembra de embriones

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la recuperación de los embriones y su siembra no supere las 2 horas en el medio de conservación embrionario. Si se trata de embriones previamente congelados, el tiempo máximo entre descongelamiento y siembra se reduce a 20 o 30 minutos. Los 2 métodos más utilizados en la siembra de embriones son el quirúrgico o no quirúrgico por laparoscopia (González y col. 1991). En ambos casos se procede a realizar una punción en la cara dorsal del cuerno uterino, a 1 cm de la unión utero tubárica. Mediante una micropipeta, se deposita el embrión en la luz uterina (acondicionado en 10 µl de PBS). Existe una técnica combinada en la cual se visualiza el cuerno uterino por laparoscopia, se realiza una pequeña incisión de 1 cm en la línea media abdominal, y mediante una pinza no traumática, se exterioriza el cuerno uterino para realizar la siembra embrionaria (Siembra semi-quirúrgica de embriones). El sitio habitual de siembra de los embriones es el cuerno ipsilateral del ovario con cuerpo lúteo. Se debe tener la precaución de evitar una lesión traumática del cuerpo lúteo durante la manipulación de la siembra embrionaria. En referencia a la siembra embrionaria por vía cervical, es de muy baja utilización debido a la dificultad que presenta el paso del cérvix (Lewalski y col. 1991, Flores-Foxworth y col. 1992, Wulster-Radcliffe y col. 1999). Recientes trabajos de Masoudi y col. (2012) consideran la factibilidad de utilizar la siembra transcervical embrionaria mediante tratamientos combinados de estradiol y oxitocina. En Brasil, se ha comenzado con la transferencia transcervical de embriones en cabras. Si bien los primeros ensayos se han realizado con un número reducido de donantes, se ha logrado obtener un 50% de sobrevivencia embrionaria (Fonseca, comunicación personal).

En las cabras lecheras se ha determinado una tasa superior de sobrevivencia embrionaria (crías nacidas/embriones transferidos) cuando se realiza una siembra doble (Moore y Eppleston 1979, Armstrong y col. 1983, Tervit y col. 1983). En los ovinos, Baril y col. (2003) informaron que la tasa de supervivencia de embriones es superior cuando se transfieren por pares que cuando se transfiere sólo un embrión. Sin

embargo y en oposición a estos resultados, Cseh y Seregi (1993) obtuvieron una mayor sobrevivencia embrionaria al sembrar un embrión por hembra receptora. Por consiguiente, se debe considerar la capacidad de cría de la hembra receptora para no afectar el crecimiento de las crías post parto.

La utilización del laparoscopio permite realizar una buena clasificación de las receptoras por su respuesta ovulatoria. En ciertas oportunidades y en especial cuando se trata de cabras, se presentan receptoras con folículos quísticos o cuerpos lúteos regresados. Estas hembras no deben ser utilizadas como receptoras. Se debe asegurar que se dispone de hembras con uno o dos cuerpos lúteos correspondientes al día 6 o 7 del ciclo estral. Asimismo se debe tener presente, al realizar la selección de las receptoras, que la sobrevivencia embrionaria estaría influenciada por el número de cuerpos lúteos. Armstrong y col. (1983) obtuvieron valores del 52, 63 y 75% de sobrevivencia embrionaria con recipientes con 1, 2 y 3 cuerpos lúteos. Sin embargo Bari y col. (2001) no consideran que se presenten diferencias significativas. A su vez estos autores, mencionan que la edad y pariciones anteriores de las ovejas receptoras adultas no afectan la tasa de sobrevivencia embrionaria. Se ha mencionado el "efecto donante" como la variabilidad que se puede presentar en la tasa de sobrevivencia de embriones (0 a 78%) para una igual calidad embrionaria entre distintas madres (Heyman y col. 1987).

Es muy importante considerar el tiempo y la logística entre la recuperación, búsqueda y clasificación hasta la siembra de los embriones. Debido al trabajo que implica la realización de un programa de TE, debe estar muy bien organizado y coordinado para obtener óptimos resultados.

### Eficiencia reproductiva de la transferencia de embriones

A continuación se presentan valores medios de referencia de la eficiencia de las diferentes etapas de la OM y TE:

- Número de cuerpos lúteos por hembra donante: ovino, 11.
- Tasa de recuperación de embriones + ovocitos por vía quirúrgica: 60 a 70%.
- Tasa de fertilización por IA laparoscópica con semen fresco: 80%.
- Tasa de selección de embriones para congelamiento: 80 a 90%.
- Tasa de selección de embriones post descongelamiento: 70 a 90%.





- Tasa de sobrevivencia embrionaria por siembra directa: 60-70%.
- Tasa de preñez por siembra directa: 50-70 %.
- Número de crías nacidas por hembra donante: inmediata 4 corderos/oveja donante. congelados: 2 a 3.2 corderos/oveja donante.

### CONCLUSIONES FINALES

La transferencia de embriones permite incrementar el número de crías de una hembra genéticamente superior, logrando obtener en promedio 4 crías por tratamiento de ovulación múltiple. Los recientes avances en el incremento de la eficiencia reproductiva en la TE han ampliado la posibilidad de su utilización en los programas de mejoramiento genético aumentando la difusión de los genes de las ovejas de

alto valor productivo. Futuras investigaciones serán necesarias para reducir los costos e incrementar el número de crías por oveja donante para facilitar su aplicación comercial, como se ha logrado en la especie bovina.

No cabe duda que actualmente la transferencia de embriones es el método más seguro en el aspecto sanitario, para realizar la importación de diferentes biotipos de alta producción. El incremento del comercio internacional de material genético mediante la transferencia de embriones demuestra la importancia que tiene esta técnica como reaseguro sanitario frente a las enfermedades exóticas y como herramienta del mejoramiento genético para la producción animal.

## EL BIENESTAR ANIMAL Y LOS MERCADOS: ROL DE LA PROFESIÓN LIBERAL

*Stella Maris Huertas Canén*

DMTV, Magíster en Salud Animal - stellamaris32@gmail.com, Centro Colaborador OIE en Bienestar Animal y sistemas de producción pecuaria, Chile-Uruguay-México. Facultad de Veterinaria - Universidad de la República.

Lasplaces 1550 CP11600 Montevideo, Uruguay

El Bienestar Animal (BA) es un tema complejo, de múltiples facetas que incluyen aspectos científicos, éticos, económicos y políticos, así como culturales y religiosos (Fraser, 2008). Tiene raíces multidisciplinarias comprendiendo también otras ciencias tales como la etología, fisiología, patología, bioquímica, genética, inmunología, nutrición y epidemiología, entre otras.

La Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO) establece el estrecho vínculo existente entre el uso de animales para diversos fines y el bienestar de los seres humanos (FAO, 2009).

Por su parte, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) identificó al BA como una de las prioridades para su plan estratégico en el 2001 y lo viene reafirmado en los sucesivos planes estratégicos hasta el presente. Los Países y Territorios miembros encargaron a la OIE ya que es la Organización Internacional de referencia para la sanidad animal, asumiera el liderazgo en este campo y, elaborara estándares y directrices sobre el BA, reafirmándolo como un componente clave de la sanidad y producción animal (OIE, 2013).

En las cadenas productivas se observa un gran número de actores involucrados, tales como productores, encargados de animales, transportistas, empleados de las plantas industrializadoras, profesionales, entre otros, quienes juegan un rol fundamental. Si éstos no desempeñan bien su tarea pueden llegar a deteriorar severamente el bienestar de los animales productores de alimento. Estos actores "clave" deben estar debidamente formados para ser los motores del cambio global en materia de BA que se percibe para un futuro cercano (Grandin, 2000; Gallo 2008, 2012).

La OIE ha promovido la creación de sucesivos grupos de trabajo *ad hoc* conformados por expertos internacionales en temas de BA, quienes elaboraron capítulos que fueron incluidos en el Código Sanitario para los Animales Terrestres (Código Terrestre) tales como: transporte de animales por tierra, mar y aire; sacrificio de animales para consumo humano y con fines profilácticos; control de perros vagabundos; uso de animales en investigación y educación; BA en sistemas de producción de ganado vacuno para carne y BA de peces de piscicultura (OIE, Código Terrestre, 2013).