

120
Zej



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán

COLECCION DE EMBRIONES EN
CONEJA (Oryctolagus cuni-
culus), COMO MODELO DIDAC-
TICO - TEORICO - EXPERIMENTAL
DE LA TRANSFERENCIA DE
EMBRIONES A NIVEL LABORA-
TORIO.

Tesis Profesional

Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

VILLEGAS ROBLES RAFAEL

Asesor: M.V.Z. ARMANDO ENRIQUE ESPERON SUMANO

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
RESUMEN.	I
INTRODUCCION.	1
1. Selección de donadoras y receptoras.	6
2. Superovulación.	11
3. Detección de estro y fertilización.	18
4. Sincronización de los ciclos estrales.	19
5. Recolección de embriones.	19
6. Identificación embrionaria.	26
7. Evaluación embrionaria.	28
8. Almacenamiento y conservación embrionaria.	34
9. Transferencia embrionaria.	40
10. Evaluación de la transferencia.	45
OBJETIVOS.	45
MATERIAL Y METODOS.	46
CONCLUSIONES,	53
ANEXOS.	
1. Fisiología reproductiva de la coneja.	55
11. Ventajas y desventajas del método de transferencia embrionaria.	62
BIBLIOGRAFIA.	66

RESUMEN

En la actualidad, no hay duda, que las investigaciones - básicas con embriones de ratón y coneja, han contribuido a nuestro entendimiento de la reproducción.

Por lo que el presente trabajo, se enfoco a plantear, de sarrollar, evaluar y promover un modelo experimental de instrumentación y comprobación biológica de un método -- práctico y economico de la transferencia de embriones en conejos, a nivel de práctica de laboratorio, de la asignatura de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la U.N.A.M. .

Para llevar a cabo la técnica de la transferencia de embriones, fueron necesarios procedimientos y prácticas metódicas, que involucraron numerosos pasos para realizarla con éxito: estos comprendieron:

1. Selección de donadoras y receptoras.
2. Superovulación.
3. Detección de estro y fertilización.
4. Sincronización de los ciclos estrales.
5. Recolección de embriones.
6. Identificación embrionaria.
7. Evaluación embrionaria.
8. Almacenamiento y conservación embrionaria.
9. Transferencia embrionaria.
10. Evaluación de la transferencia.

Los resultados que se obtuvieron fueron buenos desde el punto de vista didáctico, puesto que se comprendió de -- una manera más clara la técnica de transferencia de embriones, ya que antes solo se planteaba a nivel de pizarra ó bien tan solo con la proyección de diapositivas.

Con lo que los alumnos pensaban, que esta técnica era su mamante fácil e infalible.

Desde el punto de vista biológico, los resultados fueron condicionados a la técnica de enseñanza-aprendizaje que se eligió: Al ser una técnica demostrativa, el alumno al implementar el método carece del dominio de este, por lo que los resultados parecieran ser negativos (no se obtuvieron gestaciones, a partir de los embriones transferidos). Sin embargo, se considera que la experiencia adquirida, puede mejorarse a través de implementarla de manera continua, es decir no solo restringirla a una asignatura, sino darle continuidad dentro de otras asignaturas, tales como: Técnicas Quirúrgicas, Terapéutica Quirúrgica ó Clínicas. Cumpliéndose así con la secuencia, continuidad e integración de los conocimientos.

Además, a manera de consulta se citaron dos anexos, para una mejor comprensión de la fisiología reproductiva de la coneja, y de las ventajas y desventajas que encierra esta metodología.

INTRODUCCION

"...Es por ésto que antes de experimentar en animales grandes, uno debe intentar sus ideas en animales pequeños."

Dr. M. C. Chang (32)

Los modelos en animales de laboratorio, son indispensables para la comprensión, entrenamiento y educación continúa de un amplio rango de disciplinas relacionadas con la biología reproductiva.

El uso de animales de laboratorio (ratones y conejos), hacen posibles los estudios de similaridades y diferencias entre especies e indica las ventajas y desventajas de la extrapoliación, además, la habilidad ó maestría para recobrar, evaluar, cultivar y manipular embriones de ratón y coneja, es igualmente un excelente entrenamiento para el manejo de valiosos embriones de animales domésticos.

Es por ésto, que en el presente no hay duda que las investigaciones básicas con embriones de ratón y coneja, han contribuido a nuestro entendimiento de la reproducción; ó bien que tendrán un papel irremplazable en el futuro, para la investigación y la práctica de la reproducción animal, y también para el desarrollo de la ingeniería genética en biología. (32, 36, 40, 54, 75, 80)

La coneja, es la primera especie en la cual se experimentó la transferencia de embriones, y desde ese tiempo ella representa un sujeto de elección para los estudios fundamentales sobre dicha técnica; contribuyendo en el curso de los años a el desarrollo de la misma. (1, 2, 6, 25, 32, 36, 37, 44, 51, 60, 72, 80)

La transferencia embrionaria, es una de las técnicas más modernas y revolucionarias en el campo de la reproducción animal, y que, en los últimos años a cobrado gran auge en países adelantados tales como: Inglaterra, Australia, N. Zelanda, Ca

nada, E.E.U.U. y algunos países asiáticos y europeos, entre otros. Marshall et. al. en 1978; mencionan que la transferencia de embriones, es una gran industria en Australia y N. Zelanda, más que en Europa. En México esta técnica es relativamente nueva en el campo profesional veterinario, ya que hasta el 17 de marzo de 1980, en Ajuchitlán Qro., el Dr. Crisólogo-Garza Chapa et. al. del Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal (I.N.I.A.R.A.) dependiente de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (S.A.R.H.) lograron obtener la primera cría de la raza holstein, a la que llamaron "Paty I", y dos meses más tarde consolidaron esta técnica con el nacimiento de tres nuevas crías, que se obtuvieron de una sola vaca. Mientras que en E.E.U.U., en 1951-Willet et. al., reportaron el nacimiento del primer ternero vivo mediante el uso de esta técnica. (58, 59, 97)

A partir del nacimiento, de estas crías, ha venido creciendo el interés por conocer y aplicar la técnica de transferencia embrionaria, a tal grado que ya son varias las empresas (Lala S.A., Carnation S.A., Nestle S.A., etc...) que aplican esta técnica en sus programas de investigación y expansión. (97)

A la fecha más del 90% de la actividad comercial de la transferencia embrionaria a sido efectuada en el ganado bovino. Sin embargo, el potencial de la técnica también ha captado el entusiasmo y la imaginación de los investigadores y criadores de otras especies animales (incluyendo el humano), y de conservacionistas, preocupados por la preservación de las especies en peligro de extinción. (6, 7, 8, 9, 10, 23, 24, 33, 36, 41, 49, 54, 59, 69, 78, 80, 82, 83, 88, 90, 94, 98, 100, 103, 107, 108, 109, 114, 115, 118)

Y a pesar que la mayoría de los embriones transferidos comercialmente son de bovinos, la literatura menciona que se trato primariamente con embriones de animales de laboratorio; teniendo esto un gran significado para la investigación y ---

práctica con otras especies. (34, 36, 54, 75)

Tomando en cuenta las perspectivas que por su aplicación y resultados nos ofrece ésta técnica, los médicos veterinarios que de alguna manera están vinculados con la reproducción animal, se han introducido a la práctica de ésta, previniéndose que dentro de poco tiempo se tendrá que manejar este método de la misma manera que se practica la inseminación artificial actualmente. (5, 37, 47, 90, 97, 109)

Desde 1885 el doctor inglés Walter Heape realizó un "Manual", para que estudiantes de veterinaria, aprendieran el manejo de embriones; utilizando para ello animales de laboratorio (conejos); posteriormente este trabajo fué publicado como un apéndice para la 2a. edición de el libro "Elementos de Embriología" de Foster y Balfour en 1885.

La técnica de la transferencia de embriones, es consecuencia de una serie de investigaciones científicas, que se iniciaron cuando el doctor Heape, el 27 de abril de 1890, en la universidad de Cambridge, Inglaterra: recolectó los cigotos, en estadio de 2 a 4 blastómeros de una coneja de raza angora, y que fueron transferidos a una coneja de raza belga, con éxito, ésto es obteniendo crías de raza angora y de raza belga, sin que las características genéticas de la nodriza receptora afectaran el desarrollo de los embriones exógenos (angora). Más tarde un experimento parecido fué reproducido por el mismo autor en 1897, con igual éxito.

El trabajo de Heape en conejos fué llamado a responder una "pura" cuestión científica, de si el medio uterino influía en el fenotipo del embrión, y a definir los supuestos mecanismos de la telogonia. Más sin embargo, en su reporte de la primera transferencia embrionaria, Heape no describió como obtuvo sus embriones del oviducto.

Posteriormente, en 1922 Biedl et. al., fueron los primeros en verificar el trabajo de Heape. (11, 16, 20, 23, 24, 32, 36, 37, 38, 44, 47, 54, 74, 75, 76, 80, 96, 97, 109, 116)

El método presenta un doble interés

- Científico
- Zootécnico

Desde el punto de vista científico permite analizar más íntimamente los problemas fisiológicos, bioquímicos, genéticos e inmunológicos de la reproducción. Favorece el estudio del desarrollo embrionario antes y después de la implantación; además de determinar los grados de expresión genética fetal y materna por separado, y las interacciones entre el medio ambiente y el genotipo.

En el plano zootécnico, ésta técnica trata de aprovechar al máximo el número de gametos producidos por una hembra genéticamente superior, y aunque los ovarios de los mamíferos con tienen cientos de miles de ovocitos, el número de la progenie que una hembra produce es pequeño, en relación a su capacidad real.

En los animales domésticos, el número de veces que una hembra puede quedar preñada se ve limitada por el período que dura la gestación, la edad a la concepción y el restablecimiento de la capacidad reproductiva después del parto.

El número de crías que una hembra puede producir durante su vida, se incrementa en gran medida por la técnica de transferencia de embriones. (11, 29, 34, 38, 47, 52, 58, 59, 64, 67, 74, 78, 79, 80, 97, 107, 109)

Para llevar a cabo la técnica de transferencia de embriones son necesarios procedimientos y prácticas meticulosas, -- que involucren numerosos pasos para realizarla con éxito. Como son:

1. Selección de donadoras y receptoras
2. Superovulación
3. Detección de estro y fertilización
4. Sincronización de los ciclos estrales
5. Recolección de embriones
6. Identificación embrionaria

7. Evaluación embrionaria
8. Almacenamiento y conservación embrionaria
9. Transferencia embrionaria
10. Evaluación de la transferencia

1. Selección de donadoras y receptoras

La selección se realiza en base a diversos parámetros, tales como:

1.1 Donadora

La hembra donadora será aquella cuyos óvulos son fecundados y luego extraídos, por cualquier método, de su matriz.

Las características que deberá tener son:

1.1.1 Deberá tener un peso normal de acuerdo a su edad, raza y fin zootécnico. Romero *et. al.* 1983, mencionan que en conejas donadoras se prefieren de un peso de 2.5 a 3 kg., -- considerando la raza. Con respecto a la edad, estos autores sugieren, que se consideran aptas cuando ya están en la etapa de pubertad, relacionándose su tamaño de acuerdo a la raza. (Ver cuadro 1)

Sin embargo, así mismo consideran como animal ideal, -- aquel que ha tenido varias crías ó partos.

Cuadro 1. Edad a la pubertad en conejas de diferentes razas.

RAZA	EDAD A LA PUBERTAD EN MESES
Raza Pequeña <u>1/</u>	4 - 5
Raza Mediana <u>2/</u>	5 - 7
Raza Grande <u>3/</u>	7 - 9

1/ Raza Habana

2/ Razas Nva. Zelanda, California, Chinchilla

3/ Razas Flandes, España, Azul de Viena.

Adaptado de Romero *et. al.*, 83.

1.1.2 Se establecerá un examen clínico ginecológico, para detectar alteraciones orgánicas que puedan influir negativamente sobre la fertilidad.

Con respecto a este punto, se recomienda lo siguiente:

- Hacer una palpación para el diagnóstico de preñez ó -- no preñez, a los 15 días de recibir la coneja.
- Hacer una observación de calores (frecuencia). El es--tro se determina en las conejas, por medio de la visua--lización de la vulva (de color rojo fuerte y de apa--riencia tumefacta), en caso de que la hembra no se en--cuentre en estro, la vulva se apreciará de color rosa--pálido y de apariencia seca.
- No debe tener adherencias en la vulva ó cualquier tipo de secreción purulenta ó de otro tipo. (97)

1.1.3 La donadora no debe estar lactando. Para determi--nar esto, Romero et. al., 1983 recomiendan lo siguiente:

Las conejas que estén lactando serán detectadas por:

- Tener a sus crías
 - Glándulas mamarias inflamadas y rojas
 - Desprendimiento de pelo, en la zona donde se localizan las glándulas mamarias.
 - Al presionar los pezones se observará salida de leche.
- Por otro lado, Harned y Casida, 1969; mencionan que nin--gún animal de granja muestra un estado fértil tan pronto des--pués del parto, como sucede en varias especies salvajes y de--laboratorio, incluyendo el conejo doméstico.

En su trabajo, estos autores estudian varios aspectos re--productivos de los conejos, relacionandolos con el amamanta--miento y el intervalo para la cruce al post-parto. Siendo los resultados los siguientes:

- En las conejas primíparas, el amamantamiento no tuvo efecto significativo en la incidencia del apareamiento. Sin embargo, un alto porcentaje de hembras aceptaron a el macho en el día 1, más que en el día 4 post-parto.

($P > 0.01$)

En conejas múltíparas, no hubo diferencias significativas, en las características del apareamiento, debido al día 6 al amamantamiento.

Una alta proporción de conejas primíparas no amamantan do, ovularon más que las que estaban amamantando. ($P > 0.01$) Las características ovulatorias, no fueron afectadas significativamente, por el día 6 el amamantamiento en las conejas primíparas que en las conejas múltíparas.

- No hubo diferencias significativas, en la sobrevivencia embrionaria temprana (preimplantación), entre grupos que estaban amamantando y los que no, ni aún entre las conejas primíparas y múltíparas. Sin embargo, la sobrevivencia embrionaria tardía (post-implantación) fué menor en el grupo de conejas amamantando que en las que no, en cada grupo de paridas ($P > 0.05$). (36, 55, 97)

1.1.4 El ciclo estral de las donadoras, deberá ser normal (en presentación y duración). En un trabajo elaborado, como seminario en la materia de reproducción animal e inseminación artificial, Naciff y Vertiz en 1986 mencionan que en las conejas, los ciclos estrales pueden presentarse normalmente cada 17 días, pero algunos autores afirman que es cada 7 días. En base a estos datos Maurer en 1978, citado por Daniel en 1978 recomienda poner a la coneja con el macho cada 4 - 5 días, que es el tiempo estimado del ciclo estral de la coneja. Con lo cual, los machos más activos podrán montar a la coneja en estro ó receptiva, inmediatamente, permitiendo que la hembra sea montada dos veces, ya sea por el mismo macho ó por dos diferentes machos, los cuales podrán ser fertilizados (ovulación refleja ó inducida).

Por otro lado Hafez en 1970, en "Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals"; menciona que la cone

ja puede presentar tres tipos de comportamiento en relación a el ciclo estral:

- Aceptar al macho cada 17 días, luego de la maduración de los folículos durante el celo. El acoplamiento provoca la ovulación (ovulación refleja ó inducida), la luteinización y el desarrollo de los cuerpos luteos jóvenes. Si no hay fecundación, los cuerpos luteos jóvenes involucionan.
- Aceptar al macho todos los días; la hembra receptora, sustituye los folículos atresicos.
- Presentar ciclos regulares de 4 a 7 días promedio.

(36, 51, 84, 97)

1.1.5 La donadora deberá estar libre de enfermedades infectocontagiosas. Esto se determinará mediante pruebas de laboratorio específicas al padecimiento que se sospeche y sometiendo al animal a cuarentenas (previamente, tanto donadoras, como receptoras, habrán sido vacunadas y deberán estar libres de parásitos gastrointestinales). (60, 78, 97)

1.1.6 Se someterá a la donadora a un regimen alimenticio, esto es, que se revisará el alimento consumido y se verá, que llene los requerimientos nutricionales de mantenimiento, reproducción, gestación y lactancia.

Este punto es clave para que la donadora proporcione muchos embriones. Como parte de los preparativos de las donadoras, deberán estas tener un acceso libre al agua y recibir una ración diaria de 200 gr. a 250 gr. de un concentrado para conejos con un 17-18% de proteína, para razas pequeñas y grandes respectivamente. (56, 96, 97)

1.1.7 La donadora debe ser un animal muy valioso genéticamente. (7, 12, 13, 14, 32, 45, 51, 52, 63, 64, 70, 78, 96, 97)

1.2 Receptoras

La hembra receptora será aquella que recibe en su matriz el ó los embriones de la hembra donadora. (12)

Las características que deberá tener son:

1.2.1 Tendrán un peso adecuado a su edad, raza y función zootécnica. (96, 97)

1.2.2 Se determinará mediante un examen clínico-ginecológico la normalidad orgánica y funcional del aparato reproductivo de las receptoras. (97)

1.2.3 Estas, deberán estar libres de enfermedades infectocontagiosas. (97)

1.2.4 Deberán además, estar sometidas a un régimen alimenticio que satisfaga todas sus necesidades, tanto de mantenimiento, gestación y lactancia. (97)

1.2.5 Las receptoras, se pretende que sean grandes y bien desarrolladas. Además, de que se requiere que éstas posean una habilidad materna, que permita ó aumente las probabilidades de éxito ó la viabilidad de la ó las crías: esta cualidad, puede ser determinada genéticamente. (31, 36, 96, 97)

1.2.6 Además estas, deberán tener cierto grado de sincronización estral ó de celo con la donadora, sea este natural ó inducido con un tratamiento hormonal.

Chang en 1950, usando conejas, demostró por medio de la transferencia embrionaria, que para establecerse la gestación es necesario que exista una sincronía entre el embrión y su ambiente, así como todo lo relacionado con la edad de el cuerpo lúteo. Adams en 1971, menciona que observaciones hechas en conejos y hurones, revelan que embriones transferidos asincrónicamente pueden desarrollarse por variados periodos de tiempo, llegando a veces más allá de la implantación, pero inviablemente fallan antes de alcanzar estadios fetales.

El rango óptimo de diferencia entre el estro de la donadora y la receptora, es de \pm 12 horas, y los mejores porcentajes de fertilidad se obtienen, cuando coinciden exactamente los estros (70% de fertilidad).

Si la diferencia entre estros es mayor de 12 horas, los porcentajes de fertilidad pueden fluctuar entre 45 - 60%.

Este paso tan importante, es factible de conseguirse por alguno de los siguientes métodos:

- Hembras que al azar, estén en calor ó estro el mismo día que la donadora (natural).
- Por medio del control del amamantamiento.
- Por medio del uso de la hormona liberadora de gonadotropinas (G.N.R.H.). Desde el punto de vista comercial, se sugiere la utilización de un polipéptido altamente eficaz, análogo químico de la hormona liberadora de gonadotropinas.

El nombre genérico internacional de esta sustancia activa es buserelina. Sugiriendo una dosis de 0.00084mg. de acetato de buserelina (0.2 ml. de "Conceptal"), por vía intramuscular de preferencia, pero siendo también posible la aplicación intravenosa ó subcutánea.

- Por medio de la aplicación de gonadotropina coriónica humana (H.C.G.), en una dosis de 10 25 U.I./kg. ó el uso de 0.5 mg./kg. de hormona luteinizante (L.H.).

Para producir sincronía entre la receptora y la donadora, la aplicación de cualquiera de estas hormonas, se efectúa en la receptora al mismo tiempo que a la donadora se le da monta. Aproximadamente de 10 a 12 horas post-inyección se produce la ovulación.

- Por medio de la utilización de un macho vasectomizado, para estimular la ovulación de la receptora. Aproximadamente a las 12 horas post-monta se produce la ovulación. (1, 31, 51, 52, 57, 74, 96, 97, 103)

2. Superovulación

La transferencia embrionaria, se basa fundamentalmente, en el proceso de superovulación; este proceso es definido por Pineda y Bowen, Bearden y Fuquay, en 1980, citados por Hernandez y Hernandez en 1985, como la respuesta ovulatoria incrementada por arriba del número que normalmente ocurre en un --

animal, por la administración de hormonas gonadotrópicas exógenas. Sin embargo, la misma respuesta se puede observar con la administración de otros compuestos, como: anticuerpos, fármacos, etc... Aunque comunmente ésto es logrado por medio del uso de hormonas hipofisiarias y placentarias (gonadotropinas), tales como:

- Gonadotropina del suero de la yegua preñada (P.M.S.G.)

Esta hormona es la de más amplio uso en la actualidad, - tal como lo demuestran algunos trabajos publicados. (65, 78, - 117)

Avila, 1980 menciona que las ventajas de la P.M.S.G., sobre la hormona folículo estimulante (F.S.H.), es que no resulta inactivada, tan rapidamente por el organismo, por lo que - tan solo se requiere de una sola aplicación de la primera.

La desventaja es que no existe un control adecuado de su acción y por lo tanto no puede asegurarse una respuesta superovulatoria adecuada, además de que ésta hormona puede producir shock anafiláctico, debido a que proviene de otra especie animal. Maurer, Hunt y Foote en 1968, por resultados obtenidos de 2 bioensayos para antihormonas, sugieren que la disminución de la respuesta superovulatoria del grupo tratado experimentalmente con P.M.S.G. y gonadotropina coriónica humana (H.C.G.), es debida a una refractoriedad hormonal, debida a - antihormonas. (71)

Existen diferentes dosis recomendadas para la utilización de esta hormona, como son:

Kenelly y Foote en 1965, utilizan una dosis de 25 U.I. - de P.M.S.G. por tres días, ésta dosis será administrada de la siguiente manera:

Día	Horario	Dosis	Vía
1	8:00 am	12.5 U.I.	Intramuscular
	5:00 pm	12.5 U.I.	Intramuscular

Continua...

Día	Horario	Dosis	Vía
2	8:00 am.	12.5 U.I.	Intramuscular
	5:00 pm.	12.5 U.I.	Intramuscular
3	Igual		
4	8:00 am.	2.5 mg. De hormona luteinizante (L.H.), disuelta en SSF a razón de 5 mg./ml.	Intravenosa

Maurer et. al. en 1968, reporta el uso de la P.M.S.G., - en conejas bajo el siguiente esquema:

Día	Dosis	Vía
1	30 U.I.	Subcutánea
2	30 U.I.	Subcutánea
3	30 U.I.	Subcutánea
4	50 U.I.	Intravenosa
	De H.C.G.	

Estos autores, siguiendo el mismo esquema, llegarón a va riar la dosis de P.M.S.G. hasta 60 U.I. por día, durante 3 -- días, y a la de H.C.G., hasta 200 U.I. (71)

Hafez en 1978, recomienda la utilización de 100-150 U.I. de P.M.S.G. por vía intramuscular y de 66 a 72 horas después- la aplicación por vía intravenosa de 50 a 60 U.I. de H.C.G., - para la superovulación en conejas. (51)

Sin embargo, en general, parece que no se requiere la ad ministración excesiva de L.H. en forma de H.C.G. para garanti- zar que la ovulación va a ocurrir después de la utilización - de P.M.S.G., que ha provocado un crecimiento folicular excesi vo. (21)

- Hormona folículo estimulante (F.S.H.)

En algunos experimentos la respuesta superovulatoria, ha sido buena. Sin embargo, Seidel *et. al.*, 1978; citados por -- Wilmut, 1980, mencionan que la labor suplementaria de inyectar 2 veces al día puede limitar el empleo de esta hormona. (3, 65, 113)

Kennelly y Foote en 1965, mencionan que se puede utilizar F.S.H. para la superovulación en las conejas, sugiriendo el siguiente esquema:

Día	Horario	Dosis	Vía
1	8:00 am.	0.5 mg.	Intramuscular ó Subcutánea
	8:00 pm.	0.5 mg.	Intramuscular ó Subcutánea
2	Igual		
3	Igual		
4	8:00 am.	1.5 mg/kg De L.H.	Intravenosa

Una metodología similar propone Maurer en 1978, en el libro " Methods in mammalian reproduction " de Daniel J. C., -- con los siguientes pasos:

Día	Dosis	Vía
1	0.4 mg.	Subcutánea
2	Igual	
3	Igual	
4	Inducción a la ovulación con L.H. y posteriormente es inseminada - artificialmente.	

La hormona folículo estimulante, que estos autores mane-
jaron, esta en una solución acuosa de metil celulosa al 1%.

(36)

- Extracto pituitario anterior equino (H.A.P.).

Adams en 1980, reporta que 6 de 26 conejas donadoras, -- fueron superovuladas con un tratamiento de una preparación de extracto pituitario anterior equino, tal como es descrito por el mismo Adams en 1971 de acuerdo al método de Moore y Shelton en 1964. La aplicación de esta preparación es por vía subcutánea 2 veces al día durante 3 días, con una dosis total de 12 mg.; 12 horas después de la última inyección de H.A.P., -- las conejas serán servidas por 2 machos fértiles y se les --- aplicará 25 U.I. por vía intravenosa de H.C.G. . (1, 2, 78)

- Menotropinas (H.M.G.).

Recientemente se han sumado al régimen superovulatorio - las menotropinas: Gonadotropina menopausica humana (H.M.G.).

Alcivar et. al., en 1983; Mc. Gowan et. al., 1983, 1985; reportan haber obtenido resultados similares a los obtenidos con F.S.H. y P.M.S.G. . (77, 78)

Sin embargo Alcivar et. al., en 1984, comparando a la -- F.S.H. contra la H.M.G., obtuvieron más gestaciones (P 0.10), con el uso de F.S.H., que con la H.M.G. (29% contra 13% res--pectivamente). (3)

- Secreción de las copas endometriales de la yegua ges--tante (P.M.E.G.).

Otra hormona superovulatoria de poco uso ó de uso poco - común, es la: Secreción de las copas endometriales de la ye--gua gestante. Sreenan en 1983, reporta que esta hormona tiene un efecto similar al de P.M.S.G. . (78)

La utilización de éstas hormonas, se asocia al uso de -- otras hormonas ó sustancias que favorecen ó mejoran la utili--zación de las drogas superovulatorias, tales como:

- Gonadotropina coriónica humana (H.C.G.).

Esta hormona, ha sido utilizada en distintas dosis con - gran éxito en la inducción de la ovulación en las conejas.

Sin embargo, a nivel comercial se menciona que a pesar - de que para este fin, se han utilizado hasta la fecha prepara- dos a base de H.C.G. ó de L.H., estos presentan la desven- taja de que su inyección repetida induce la formación de anti- cuerpos, y por tanto, la pérdida de su eficacia. (57, 96)

Fox y Krinsky en 1968, citados por Rojas et. al., en --- 1978, demostraron además que la H.C.G., es 5 veces más poten- te en la inducción de la ovulación en las conejas, en compara- ción con la P.M.S.G. . (96)

Shaver en 1970, reporta que la H.C.G., produce ovulación en las conejas, y que esta ocurre aproximadamente 10 horas -- después de la inyección. (104)

Hulot y Porjardieu en 1976, citados por Rojas et. al., - 1978, reportan, que con una dosis de 50 U.I. de H.C.G. por -- vía intravenosa, obtuvieron el 100% de ovulación en las cone- jas (18/18). (96)

- Hormona luteinizante (L.H.).

Pincus en 1940; Parkes en 1943, citados por Foote en 19- 63, reconocen la habilidad de la L.H., para causar la ovula- ción en la coneja.

Los resultados obtenidos por Foote en 1963, indican, que el uso de un extracto purificado de L.H. (P.L.H.), es capaz - de inducir a la normal ovulación, con la subsecuente forma- ción de el cuerpo lúteo y mantenimiento de la gestación, en - conejas maduras sexualmente receptivas y no receptivas tambié- n.

La administración intravenosa de 0.5 mg. de P.L.H. por - kilogramo de peso corporal, produce igualmente una respuesta- satisfactoria, aún usandose el doble de la concentración.

(45)

- Factor liberador de gonadotropinas (G.N.R.H.).

Consultar página 11 (inducción a la ovulación en las co- nejas). (57)

- Drogas simpaticomiméticas.

Tales como la bromocriptina. Esta droga en animales lactantes, disminuye los niveles de prolactina y permite que el ovario responda adecuadamente al tratamiento superovulatorio. (fase experimental) (47)

- Inmunización contra hormonas esteroidales.

- a) Inmunización contra androstenediona
- b) " " progesterona
- c) " " estrógenos
- d) " " testosterona

La inmunización contra las hormonas esteroidales, puede ser activa ó pasiva, de acuerdo a si se estimula al aparato inmunocompetente del animal ó si se administran los anticuerpos. De cualquier manera, estos van a fijar a las hormonas e impiden que lleguen al órgano blanco, para ejercer su acción y como consecuencia se alteren los mecanismos de retroalimentación sean positivos ó negativos, y por tanto se produce un desequilibrio hormonal.

De las evidencias existentes, parece ser que los mejores resultados se han obtenido, con la inmunización contra androstenediona, al aumentar la tasa de ovulación. (56)

- Neurohormonales.

El proceso superovulatorio, puede también ser conseguido por medios neurohormonales, sucediéndose esto tan solo en especies de ovulación inducida ó refleja, como en la coneja, -- por el acto del coito ó bien por la estimulación mecánica de la vagina y/o cervix.

Yamane y Egashira en 1925; Hammond y Asdell en 1926; Shibata en 1931; Carlyle y Williams en 1961, citados por Staples en 1967, mencionan que un pequeño porcentaje de conejas, se sabe que ovulan después de una estimulación mecánica de la vagina y/o cervix. Este porcentaje puede ser incrementado por la administración de estrógenos y/o progesterona durante los

meses de invierno y primavera.

Chang en 1949, reporta haber obtenido más resultados en el esquema superovulatorio, cuando las conejas eran puestas con los machos para producir superovulación mediante montas, que cuando esta era inducida por medio de hormonas.

Igualmente Yoshinaga et. al., en 1968, citados por Trejo en 1972, reporta que obtuvo mejores resultados en conejas apareadas espontáneamente, que en aquellas en que se les inyectó gonadotropina coriónica humana (H.C.G.), para inducir las a la ovulación. (30, 108)

Sin embargo, Hulot y Porjardieu en 1970, encontraron que de un total de 18 hembras, 14 (78%) ovularon con el estímulo de la cópula con un macho vasectomizado, 4 (22%) de las hembras ovularon por la excitación del cuello uterino, 17 de las hembras (94%), ovularon después de la administración intravenosa de 25 U.I. de H.C.G. y que el 100% (18/18), de las conejas ovularon después de un tratamiento con 50 U.I. de H.C.G., por vía intravenosa (vena marginal de la oreja). (96)

A pesar de todo, ésta técnica debe ser manejada con cuidado, ya que Fujimoto et. al., en 1974, citado por Hahn en 1984, menciona que ésta técnica por sí misma puede incrementar el número de embriones con anomalías cromosomales. Pero Seidel Jr., en 1975, replica éste último punto, mencionando que el apropiado uso de hormonas superovulatorias raramente desvirtúa el futuro funcionamiento reproductivo. Los problemas pueden resultar si las hormonas son inyectadas con demasiada frecuencia.

3. Detección de estro y fertilización

Una vez logrado el esquema de superovulación, por cualquiera de las técnicas utilizadas, se procede a la detección del estro, en las conejas se hace a través de una apreciación visual de la vulva, aquellas que presenten una coloración roja y su aspecto edematoso, son consideradas hembras en celo.

Posteriormente, se procede a la inseminación artificial ó al apareamiento natural. (96, 97, 106)

Drost, citado por Amstutz en 1980, menciona que las condiciones creadas en el tracto genital femenino, por las hormonas superovulatorias, reducen la viabilidad de los espermatozoos, especialmente en semen congelado. Por lo tanto se hace necesario utilizar grandes cantidades de semen de alta calidad.

Maurer, citado por Daniel en 1978, reporta que cada coneja, deberá ser inseminada con un rango de 1 a 20×10^6 de espermatozoides motiles, en un volúmen de 0.4 - 0.6 ml. (36)

De acuerdo al punto anterior, Kennelly y Foote en 1965, inseminaron artificialmente a cada coneja con 0.1 ml. de semen, conteniendo más de 1×10^6 de espermatozoos motiles, al mismo tiempo que la L.H. es aplicada. (60)

La fecundación también puede lograrse, por medio del apareamiento natural de uno ó dos machos, copulando una ó dos veces seguidas cada macho. Cualquiera que sea el método utilizado para fertilizar a la donadora, el semental utilizado deberá tener una fertilidad comprobada, esto determinado mediante el número de hijas por parto y el número de montas realizadas.

(97)

4. Sincronización de los ciclos estrales

Consultar página número 10, punto 1.2.6

5. Recolección de embriones

Posteriormente, se procede a un sencillo método de recolección de los embriones, en sus primeras fases de desarrollo.

La recuperación de los embriones de las donadoras, es actualmente un pequeño componente en los programas de transferencia de embriones. No obstante, esto es probablemente la parte más interesante y excitante del trabajo. Se necesita de gran atención a los detalles que la técnica requiera, para prevenir daño al tracto reproductor y para recuperar ó recobrar el mayor número de embriones posibles. (102)

Los métodos de recolección, pueden ser los siguientes:

5.1 Quirúrgico

5.1.1 Con sacrificio de la donadora

5.1.2 Sin sacrificio de la donadora

5.2 No Quirúrgico

5.1.1 Con sacrificio de la donadora

El método quirúrgico para la recolección de embriones -- en las conejas con sacrificio de la donadora, según la mayoría de los autores, consiste en lo siguiente:

La coneja puede ser sacrificada por:

- Dislocación del cuello. (51, 96)
- Sobre dosis de barbitúricos intravenosos.

El uso de 30 mg. de pentobarbital sódico, a través de una inyección intravenosa rápida, da excelentes resultados. (1, 2)

- Inyección de 10 a 20 c. c. de aire en la vena marginal de la oreja, para provocar una embolia pulmonar.

Una vez sacrificada, se procede a la remoción del aparato reproductor de la donadora en su totalidad. (96)

5.1.2 Sin sacrificio de la donadora

Algunos autores sugieren que para la recolección de embriones en las conejas, sin sacrificio de la donadora, se efectúe bajo los siguientes esquemas:

- Lavado del aparato reproductor y recolección de embriones, empleando cirugía in situ (animal tranquilizado / anestesiado). El porcentaje de recuperación es del 40- al 80 %, de embriones con respecto a los cuerpos hemorrágicos y/o luteos presentes. (96)
- Escisión del tracto reproductor de la hembra donadora. Efectuándose éste, y el punto anterior a través de una anestesia quirúrgica. (51)

Chang en 1950, menciona que las conejas con pentobarbital sódico, a razón de 30 mg. /kg. de peso vivo. O ---

bién, inducir una anestesia quirúrgica por medio de la - inyección de 1 ml. de pentobarbital sódico, de una solu- ción de 50 mg./ml., aplicado rapidamente y posteriormen- te en forma lenta 0.2 ml./min., hasta alcanzar el plano- de la anestesia quirúrgica. (31, 35, 96)

Una vez realizada la escisión del aparato reproductor, - se efectua el lavado. El porcentaje de recuperación ó re colección es de más del 50 %; sin embargo, Rojas et. al. en 1978, citan mediante esta técnica porcentajes de recu peración de 74.5 % . (96)

Para un mejor desarrollo de la cirugía, debe el animal - estar en ayuno previo de 24 horas, afeitando y desinfectando- la zona de operación. (96)

Adams en 1971, recomienda que para facilitar su disec- ción posterior, el tracto reproductor deberá ser puesto sobre un papel filtro. (1)

Los ovarios se examinarán para cuantificar la presencia de cuerpos hemorrágicos y/o luteos (tanto para la remoción, - escisión y lavado in situ del tracto reproductor), y poste- riormente los ovarios se separarán del resto del tracto (solo cuando se hace la remoción ó la escisión). (78)

También se procurará la eliminación del tejido adiposo - circundante a los oviductos y ovarios, y también la elimina- ción de los ligamentos propios del tracto (éste punto, es de mayor énfasis cuando se remueve el tracto), preparando a este para su posterior lavado. El líquido ó medio que se utilice, - para el lavado, se inyectará a una presión suficiente para - provocar una leve distensión del tracto, arrastrando así los- embriones que pudiesen estar adosados a su pared interna. (7, 9, 51, 78, 97)

Este lavado, puede hacerse por distintas vías ó formas, - dependiendo del lapso transcurrido entre el coito y la reco- lección. (Ver cuadro 2) (78, 96)

Cuadro 2. Tiempos aproximados, en los cuales pueden ser encontrados con regularidad, estadios de implantación y blastocistos, en animales de laboratorio.

Animal	Día del hallazgo				
	2 cel.	4 cel.	16 del.	Blast.	Implt.
Gato	3m	3t	4	5-6	13-14
Hurón	3	3t	4-5	6-7	11-12
Mink	3	4	5-6	6-7	Tardia
Conejo	2	2t	3m	3t	7

1/ Solo se mencionan, especies con ovulación inducida.

2/ El día 1, en estas especies es el primero 24 horas después del coito.

3/ m= mañana

t= tarde

Tomado parcialmente de Hafez en 1978.

Vías de acceso a la región abdominal baja.

Maurer et. al., citado por Rojas et. al. en 1978, recomienda la entrada a la cavidad abdominal a través de una incisión en los flancos. O bien a través de una laparotomía medio ventral.

Vías de lavado del tracto reproductor.

- De oviducto a la unión útero-tubárica. Hasta las 65 horas post-coito, en la coneja. (96)

Algunos autores recomiendan que para realizarse el lavado de oviducto a útero, se haga uso de un tubo de polietileno de 30 cm. de largo, con una punta esmerilada e insertada en la fimbria oviductal, para la inyección del medio de lavado. Este tubo es sostenido por pinzas-

de ropa en miniatura ó por una línea de caucho de 4 -- cm., que cubre el bocado de una pinza hemostática.

(36)

Con la misma finalidad, Naciff y Vertiz en 1986, en su trabajo, hacen una innovación a el método de Maurer. Es to a través de la inclusión dentro del tubo de polieti leno, de un alma de acero (aguja del No. 22), con la - finalidad de que al momento de aplicar las pinzas que - sostienen el tubo dentro de la fimbria, no se obstruya la luz del tubo, dificultando el paso de la solución - del lavado.

- De unión útero-tubárica a oviducto.

Esta vía solo se recomienda en ciertos casos de infer- tilidad. El medio de lavado, es inyectado, dentro del- útero cerca de la unión útero-tubárica; mientras que - un tubo de polietileno es insertado dentro del infundí bulo y sostenido en su posición con una pinza y una ga sa (figura 1). (51, 96, 103)

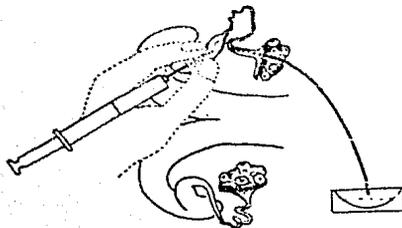


Figura 1. Lavado del tracto a través de la unión útero-tubárica

Hafez, 1978

- De cuernos uterinos ó cavidad uterina a cervix. La recolección de embriones se realiza insertando una-

cánula de vidrio dentro del útero, para recolectar los lavados como lo muestra la figura 2. (51, 52, 74, 78)

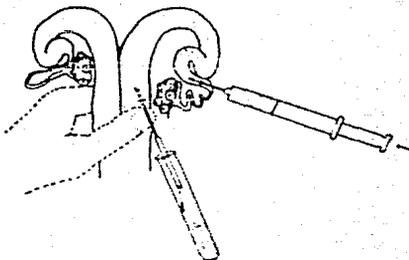


Figura 2. Recolección de blastocistos del útero.

Hafez, 1978

- De cervix a cuernos ó cavidad uterina. (96)

Adams en 1980, menciona que los embriones de coneja, entran normalmente a el útero de 72 - 84 horas después de la -- monta ó cruza. Siendo por ésto, que Rojas et. al., en 1978, - recomiendan estas vías ó formas de lavado, a partir de las 86 horas post-coito, en la coneja.

De las formas ó vías de lavado, se sugiere, que el lavado, sea efectuado 2 veces, utilizando un medio para la reco-- lección y conservación de embriones, de acuerdo a la especie-- tratada. (34, 47, 78, 79)

Maurer, 1978; citado por Daniel en 1978, reporta que los medios ó soluciones de lavado, tales como: suero tratado con-- calor, Brinster BMO-3, Mc. Coy 5a, Medio 199, Ham F 10 y --- F 12; pueden ser utilizados como medios alternativos, para la recolección y crecimiento in vitro, de los embriones de cone-- ja.

5.2 No Quirúrgico

El método no quirúrgico, es el que más se utiliza actual

mente en grandes especies, y éste ha substituido por completo al quirúrgico (en especies de laboratorio éste método solo se trabaja a nivel experimental). (103)

Moler et. al. en 1979, menciona que la recolección no -- quirúrgica, se efectúa obteniendo acceso al lumen uterino a través ó por vía vaginal ó transcervicalmente, para efectuar un lavado del órgano reproductor (útero) in situ.

En la coneja, Yoshinaga et. al., 1968; citado por Trejo en 1972, reportan que se obtuvieron buenos resultados en la recolección de embriones, usando un aparato de instalación permanente ideado por ellos, practicando la recolección de 5 a 6 días después del apareamiento.

El método de Yoshinaga, se basa en lo siguiente:

Se hacen lavados uterinos con soluciones que contengan - 10 % de suero sanguíneo de coneja ó 0.1 % de albúmina bovina, en una solución salina fisiológica a una temperatura de 35 a 37°C.

El aparato usado consiste en una bolsa de 2.5 por 3 cm., que tiene colocado en su base un tubo de salida de 20 a 30 cm. de longitud con un diámetro interno de 1 mm., y el externo de 2 mm., el tubo es colocado en la vagina y se adapta un tapón para evitar que el líquido que entra en el útero escape por aquella. Son introducidos 200 ml. de la solución de lavado a través de la vagina, por medio de una jeringa, produciendo -- compresiones y aspiraciones, al mismo tiempo que se da un masaje externo en la pared abdominal.

Los animales son semianestesiados con éter y se fijan a la mesa de disecciones, con la finalidad de efectuar el lavado.

Las conejas se lavarán, a los 3 y 6 días post-coito, aplicando, después de cada lavado 100 000 U.I. de penicilina, en el interior del útero. (108)

6. Identificación embrionaria

Una vez obtenido él ó los lavados del tracto reproductor de la donadora, se procede a la identificación de los embriones. La búsqueda deberá hacerse 2 veces, por una persona con experiencia, una tercer búsqueda será hecha por otra persona, antes de desechar el lavado.

El lavado uterino ó tubárico ó de ambos, puede ser recibido en tubos de ensayo para centrífuga, graduados y con capacidad de 50 ml. ó bien en probetas graduadas cilíndricas ó cónicas, ó bien directamente en cajas de Petri, platos de Cambridge ó vidrios de reloj.

Cuando se usan los tubos ó las probetas, éstas se dejan reposar de 30 a 60 minutos, para que los embriones por su peso específico, mayor que el del medio, precipiten hacia el fondo de estas.

Cuando el medio es muy viscoso ó se tiene alta cantidad de fibrina, la precipitación se dificulta y a veces es necesario provocar ligeras vibraciones en el recipiente para acelerarla. (78)

El proceso de sedimentación, se realiza a temperatura ambiente ó a 37°C, y al terminar esta, se sifonea ó se decanta todo el medio, excepto los 20 - 200 ml. del fondo ó se obtienen los 50 ml. del fondo de las probetas cónicas a través de una manguera de hule. El medio que resta en el fondo de las probetas, se coloca en una ó varias cajas de Petri de 100 ó 200 ml., cuadriculadas en divisiones de un centímetro cuadrado, ó bien en platos de Cambridge de 20 ml., para ser posteriormente observados al microscopio estereoscópico a 15 aumentos ó bien con un aumento de 45 a 75 X. (31, 78, 87)

La característica más importante en la localización de los embriones, es una cubierta transparente que los rodea, y que es refrigente, además que les facilita ó permite rodar en el fondo del recipiente que los contenga. Esta cubierta de as

pecto hialino, formada por mucopolisacaridos es la llamada zona pelúcida. Dentro de las funciones más importantes de ésta, tenemos:

- Evitar la poliespermia
- Permitir la compactación de los blastómeros en desarrollo.
- Impedir el ingreso de leucocitos al interior del embrión.
- Proteger de traumatismos al embrión durante su descenso por la región tubárica.
- Impedir la implantación del embrión en regiones extrauterinas.
- Evitar la quimerización (agregación), con otros embriones, en animales de ovulación múltiple.
- Mantener la osmolaridad del embrión.

Rottman et. al.; citados por Nieto en 1984, demostraron la importancia de la integridad de la zona pelúcida, en el desarrollo embrionario, ya que observaron un mayor porcentaje de implantación de embriones de ratón y conejo, liberados por estas especies artificialmente. (87)

Otra característica particular del embrión de conejo, es la presencia, en la parte externa de la zona pelúcida, de una capa de mucina, siendo esta adquirida durante su trayecto por el oviducto. Esta va a favorecer el trabajo de identificación, ya que es refringente a la luz y le da mayor tamaño. (51)

Kennelly y Foote en 1965, mencionan que cuando las células de la granulosa interfieren con la localización y conteo de los embriones, se pueden añadir 75 U.S.P. (unidades) de hialuronidasa a los lavados. (51, 60)

En condiciones prácticas, sería muy tardado examinar todo el medio obtenido por el ó los lavados, lo que se puede evitar colocando un filtro milipore de 50 UM, en la salida de la manguera del sifón. Con éste método la localización de em-

briones de una donadora, se puede hacer en 10 minutos, contra 45 a 90 minutos que se requieren, si no se usa el filtro. (78, 93) La desventaja de éste método es que el filtro se tapa con moco ó sangre. Para éste caso se sugiere el uso de un filtro-Plankton ó Nylon de 50 a 75 UM, que retiene los embriones y -piezas grandes de moco, permitiendo pasar partículas pequeñas y células sanguíneas; Nieto en 1984, reporta que el diámetro del embrión de coneja es de 120 - 130 micras. (78, 87)

El material usado, deberá estar esterilizado y siliconizado, a menos que el medio de recolección contenga suero ó --proteína sérica al 1 %, evitando así la adhesión de los em--briones a las paredes de vidrio de los recipientes. (86)

Al identificar el ó los embriones, estos se trasladarán con una pipeta Pasteur, de la caja de Petri general (de reci-bo), a una particular (aislamiento), con medio estéril fresco y enriquecido; permaneciendo ahí hasta la transferencia ó con-gelación. En éste momento el embrión es clasificado tentativa-mente como transferible ó no. (78)

7. Evaluación embrionaria.

Una vez localizados los embriones, se procede a la eva-luación de su viabilidad. Esta evaluación se puede lograr por diversos métodos ó criterios, tales como:

- Desarrollo in vitro.
- Desarrollo in vivo.
- Criterio bioquímicos
 - Consumo de glucosa
 - Consumo de oxígeno
 - Consumo de aminoácidos
 - Actividad enzimática
 - Detección del factor de gestación temprana (E.P.F.)
(Proteína con peso y estructura molecular múltiple)
- Tinciones
 - a) Fluorescentes. Schilling et. al., citados por Hafez,

en 1981, mencionan que las tinciones fluorescentes pueden ser una ayuda suplementaria, para la evaluación microscópica de los embriones.

Los métodos fluorescentes pueden ser una particular ventaja para la evaluación de embriones congelados y descongelados; ya que permiten una preselección de embriones viables para la congelación, además de una rápida y exacta determinación de las degeneraciones en los embriones, después del descongelado. (53)

b) D-acetoorceína al 1 % ó hematoxilina. Con estos procedimientos de tinción es posible determinar el número de núcleos, en cada embrión.

La presencia de núcleos indica que la fijación ó anidación in vitro, ocurrió. Siendo más simple esta técnica, que la de fragmentación de citoplasma. (36)

- Análisis cinematográfico.
- Morfometría y ultraestructura
- Aberraciones cromosómicas
- Eclosión del blastocisto in vitro
- Análisis morfológico embrionario, por medio de estereomicroscopía (10 - 80 X). (61, 87)

Es de importancia saber el rango de desarrollo en que se encuentra el embrión, ya que algunos aspectos morfológicos son importantes para determinar su futura viabilidad. (99) Schilling et. al.; citados por Hafez en 1981, reportan que las técnicas microscópicas tienen la ventaja, de poderse efectuar en el mismo sitio de la recuperación ó recolección de los embriones, y así inmediatamente poder transferir. Según estos autores hay que tomar en cuenta 2 criterios morfológicos, para la evaluación de la viabilidad embrionaria, estos microscópicamente son:

- Apariencia de degeneración y desorganización
- Retardo del desarrollo de los tejidos embrionarios. (53)

Otros puntos a considerar, en la evaluación embrionaria, por medio de estereomicroscopía son:

- No. de células (blastómeros).
- Compactación celular.
- Forma del embrión (regularidad y esfericidad).
- Tamaño embrionario.
- Color y homogeneidad del citoplasma.
- Presencia de vesículas ó de blastómeros extruidos.
- Espacio perivitelino ocupado por el embrión.
- Estadio de desarrollo del embrión, en relación a la edad embrionaria. Sanchez en 1986, menciona que esta evaluación, aunado a su morfología determina, que embriones pueden transferirse y cuales no, de acuerdo a sus posibilidades de implantación.
- Regularidad de la zona pelúcida (ausencia de fisuras).
- Presencia de desechos celulares.

(14, 78, 87, 99)

Existen varias clasificaciones, para poder evaluar los embriones obtenidos, estas se van a basar en aspectos morfológicos del embrión. Algunas de las más importantes son:

Linder y Wright en 1983, proponen la siguiente clasificación, con respecto a la evaluación morfológica del embrión y que ha sido adoptada como patron internacional.

Clasificación	Características
Excelente	El embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme.
Bueno	Imperfecciones ligeras, como pocos blastómeros alargados, forma irregular, con pocas vesículas.
Regular	Problemas definidos, pero severos, -

Continúa...

Malo

Problemas severos, numerosos blastómeros alargados, células degeneradas y de varios tamaños, gran cantidad de vesículas, pero la masa celular tiene una apariencia viable.

A pesar de la clasificación descrita en el cuadro anterior, Gustafsson en 1985, menciona que la clasificación del estadio de desarrollo del embrión, debe ser hecha al siguiente criterio:

Blastocisto: Embriones con un blastocele visible.

Morula : Embriones con más de 16 blastómeros, pero sin un blastocele visible.

Estadios

tempranos : Embriones que contengan de 2 a 16 blastómeros.

A partir de esto, el autor propone la siguiente clasificación morfológica:

Clasificación	Características
Embriones normales (N)	Embriones con clara diferenciación entre las células trofoblasticas y las células embrioblasticas, y con un distinguible blastocele; embriones sin un blastocele visible, pero con blastómeros compactados y con una apropiada tensión ó estrechez de la superficie de la masa de células. No habra células

Continúa...

Embriones morfoló-
gicamente desvia--
dos (MD)

extruidas 6 libres.

Estos son embriones, en los cua-
les la superficie de la masa de-
células muestra varios grados de
irregularidades y la mayoría de-
las células periféricas no mues-
tran una buena interrelación to-
pográfica; son embriones con cé-
lulas y detritus celulares en el
espacio perivitelino.

Embriones degenera-
dos (D)

Son embriones con signos severos
de degeneración celular; embri-
ones con blastómeros extruidos y
de diferentes tamaños.

Con excepción del análisis morfológico, los métodos para la evaluación de la viabilidad embrionaria, anteriormente ci-
tados, revisten serias limitaciones, en cuanto al tiempo, cos-
to y equipo para poderse llevar a cabo. (87)

Shea, citado por Nieto en 1984, menciona que si se pudie-
ra relacionar la morfología embrionaria, con la calidad de es-
tos; se conseguirían mayores porcentajes de preñez.

Sin embargo hay que hacer notar que la morfología del em-
brión, nos da una idea global, pero no específica sobre su via-
bilidad. (87)

Por otro lado, Greve en 1980, menciona que a pesar de ob-
tener embriones viables y con un desarrollo aparentemente nor-
mal, estos pueden poseer defectos detectables solo por estu--

dios de microscopía electrónica de transmisión.

Sin embargo, Rojas *et. al.*, en 1978, mencionan que se ha visto, que embriones de morfología atípica pueden llegar a dar crias normales. Y es por esto que a pesar de existir los criterios morfológicos suficientes, para desechar embriones, algunos autores aconsejan utilizar todos los embriones recolectados. (66, 96)

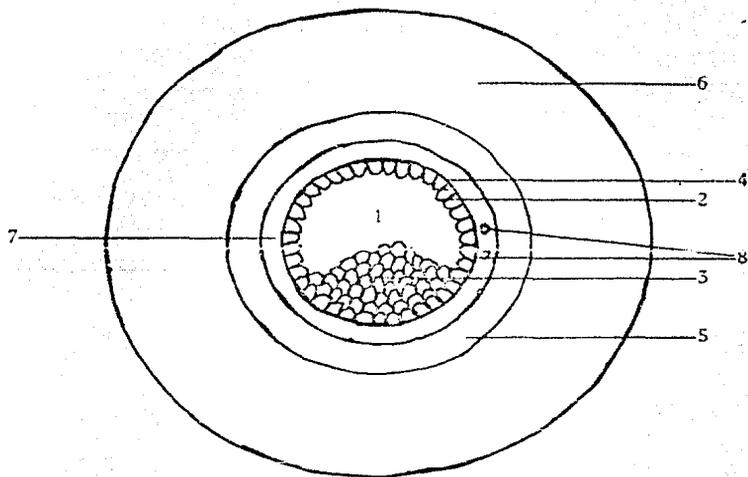


Figura 5. Representación esquemática de un blastocisto de conejo.

- | | |
|---|---------------------------------|
| <u>1</u> / Blastocèle | <u>5</u> / Zona pelúcida |
| <u>2</u> / Cel. trofoblásticas | <u>6</u> / Capa de mucina |
| <u>3</u> / Acumulo de células embrioblasticas | <u>7</u> / Espacio perivitelino |
| <u>4</u> / Membrana vitelina | <u>8</u> / Cuerpos polares |

Hafez, 1978.

8. Almacenamiento y conservación embrionaria.

Si la decisión fué la de ser transferido posteriormente, los embriones debido a su fragilidad y a su poca resistencia a los cambios físicos y/o químicos, deben de ser alojados en un líquido, que asemeje mucho al fluido natural del tracto reproductor de la hembra.

Foote y Onuma en 1970; citados por Astiazarán et. al., - en 1985, mencionan que el medio empleado para la recolección, estancia y transferencia de embriones, es de suma importancia, a la vez que consideran que un medio óptimo no debe de modificar la viabilidad de estos, durante su permanencia fuera del ambiente materno-uterino. A su vez Bates en 1985, ratifica, que la selección del medio y las condiciones óptimas de estancia, son importantes para la promoción de un seguro crecimiento embrionario. (15, 18, 52, 78)

Cualquiera que sea el medio a utilizar, debe este mantener una calidad constante, en cuanto a constituyentes específicos, así como a factores dependientes de este:

- Temperatura: de 37 a 38°C
- pH: de 7 a 7.2
- Osmolaridad: la osmolaridad óptima para el cultivo de embriones de conejo, es de 270 mOsm. (36, 97)
- Porcentaje de suero sanguíneo homólogo ó heterólogo, - termo inactivado (56°C por 30 min.), utilizado en adición al medio específico. Los requerimientos proteícos más comunmente utilizados para el cultivo de embriones, son la albúmina sérica bovina y el suero sanguíneo homólogo ó heterólogo de la especie tratada. El suero es una mezcla compleja de muchos compuestos, los cuales se encuentran aún pobremente caracterizados, además de que las concentraciones de algunos de sus componentes varían enormemente entre las diversas fracciones del mismo.

Una de las principales funciones del suero, es la de proveer cierto tipo de hormonas, así como sitios proteicos de unión, los cuales reconocen tanto a vitaminas, lípidos y algunas hormonas. Estos sitios pueden estabilizar y modular la acción de ciertas sustancias a las cuales se unen, y en algunos casos pueden además actuar desintoxicando el medio captando iones metálicos. El suero es indispensable para el crecimiento de los embriones del estadio de blástula al de blastocisto.

Yoshinaga et. al., en 1968; citados por Trejo en 1972, utilizaron como medio de recolección de embriones en la coneja, 0.1 % de albúmina sérica bovina en una solución salina tibia (35 a 37°C) ó 10 % de suero homólogo en solución salina igualmente.

Romero et. al., en 1983, mencionan que algunos autores, usan diferentes concentraciones de suero sanguíneo termo inactivado, una para el lavado uterino (recolección) y otra para la conservación de embriones; esto con la finalidad de enriquecer el medio de recolección y conservación.

Las concentraciones de suero son:

- a) Para recolección: del 2 al 10 %.
- b) Para conservación: del 25 %.

Además, estos autores mencionan que los embriones de coneja, pueden ser conservados a 10°C en suero homólogo inactivado. Este último punto es ratificado por Chang, 1948; citado por Trejo en 1972.

El suero sanguíneo de algunas especies, a excepción de el cerdo, contienen un factor letal para los embriones de coneja, afectandolos después de una exposición de 10 minutos; pero al calentar el suero a 56°C por 30 minutos, se destruye este factor. (10, 36, 97, 108)

- Esterilidad
- Atmósfera. Maurer, 1978; citados por Daniel en 1978, - menciona que para el cultivo de embriones de coneja, - el uso de una atmósfera de 5 % de CO₂ es adecuada, pa- - ra el cultivo de embriones de 2 a 4 células hasta el - estadio de blastocisto libre.
- Toxicidad del medio.
- Exposición prolongada a la luz solar. (36, 96, 97, 108)
- Presencia de nutrientes. Los embriones de coneja, para su desarrollo y conservación in vitro, han demostrado- un requerimiento específico para aminoácidos y vitam_i- - nas, además de ser afectados por los cambios en la pre- - sión osmótica y atmosférica. Cigotos y embriones de 2- - a 4 células, no se desarrollan al estadio de blastocig- - to, sin metionina, y han tenido un desarrollo reducido cuando la tirosina, cisteína, serina y treonina están- - ausentes. Maurer, 1978; citado por Daniel en 1978, men- - ciona que la remoción de vitaminas de un medio defini- - do, resulta en una disminución del porcentaje de cig- - atos y de embriones en estadio temprano de implantación a un desarrollo inmediato superior, durante el cultivo. Además, estos autores mencionan, que el desarrollo de- - los embriones de coneja no requieren de glucosa ó piru- - vato. Más sin embargo, Arreguin en 1985, menciona que- - dentro de los requerimientos energéticos para los em- - briones de rata, se encuentran el piruvato de sódio y- - el lactato de sódio los cuales son indispensables para el metabolismo del embrión en los estadios de 1 a 4 cé- - lulas. Por otra parte, tanto la glucosa como el oxaloá- - cetato han sido identificadas de igual manera, como -- fuentes energéticas importantes, siendo la primera in- - dispensable para el crecimiento y eclosión del estadio de blastocisto. (10, 36)

Los medios ó soluciones de lavado que pueden ser utilizados como medios alternativos para el crecimiento in vitro de los embriones de coneja, pueden ser:

- Suero tratado por 6 con calor
- Brinster BMOC-3
- Mc. Coy 5a
- Medio 199
- Ham F 10 y F 12
- Medio Whittingham
- Medio de Eagle

Los medios anteriores poseen un composición salina muy semejante entre sí, por lo que han sido utilizados casi de manera indistinta para el cultivo de embriones de diferentes especies. (10, 36)

Por otro lado, Adams en 1971, utilizó para sus lavados de oviductos y útero de conejas, una solución de cloruro de sódio al 0.9 %, con un volumen por lavado de 2 a 10 ml. de la solución por sección. Esta solución, debe tener un pH de 7. (1, 97)

Whittingham, 1971; citado por Astiazarán et. al., en --- 1985, reporta que a partir de 1971, la solución salina de Dulbecco (P.B.S.), enriquecida con glucosa, piruvato de sódio, antibióticos y suero, se ha venido usando casi de manera universal como medio (líquido), de recolección y transferencia de embriones en los animales domésticos. Para especies de laboratorio Oliva en 1986, utilizó una solución de fosfatos de Dulbecco estéril, suplementada con glucosa (1 gr./lt.), piruvato de sódio (28 gr./lt.), penicilina (100 U.I.) y suero homólogo (20 %).

Sin embargo, en nuestro país, esta solución presenta los inconvenientes de su elevado precio y difícil adquisición.

Astiazarán et. al., en 1985, tomando en consideración lo anterior, concluyó en su trabajo, que la solución Hartman pue

de ser utilizada como medio alternativo a la solución P.B.S., para la colecta y transferencia de embriones, siempre y cuando se encuentre convenientemente suplementada.

Recientemente, se le ha venido utilizando con éxito, la solución Hartman como medio de colecta de embriones de diferentes especies domésticas. (51, 88)

Dentro del medio de conservación y cultivo, es factible el mantener viable por un corto período de tiempo los embriones. Estos pueden ser mantenidos a temperatura ambiente (15 a 25°C), entre la colección y la transferencia.

El almacenamiento de embriones a una temperatura de 0 a 10°C ó el almacenamiento en refrigeración, detiene parcialmente el desarrollo embrionario, hasta que ellos de nuevo son re calentados a 37°C. Los rangos de preñez con embriones almacenados de esta manera por un día ó dos, son reducidos ocasionalmente. (73, 103)

Los embriones, si se requiriese pueden ser almacenados por largo tiempo, congelados a una temperatura de -196°C (nitrógeno líquido), utilizando dimetil sulfoxido como crioprotector, según lo reportan Shea y Ollis en 1977.

O bien, glicerol, cumpliendo la misma función. (70, 85, 92, 105)

Sin embargo, algunos autores como Averill et. al., en 1959 y Maurer en 1978; citados por Oliva en 1986, mencionan que la viabilidad de los embriones disminuye mucho, cuando éstos se almacenan a bajas temperaturas. Pero este mismo autor, menciona que éste método posee actualmente más ventajas sobre la refrigeración como son:

a. Las células congeladas no pueden sufrir alteraciones genéticas, ni estan expuestas a la contaminación bacteriana.

b. Se pueden transportar en forma barata y rápida embriones de animales valiosos a larga distancia y lugares poco accesibles, minimizando el riesgo de introducir enfermedades

y eliminando la necesidad de hacer cuarentenas.

c. Con la congelación se pueden almacenar embriones hasta que las pruebas de progonic esten disponibles.

Pero la gran desventaja que tiene este método, es que aún con las mejores técnicas disponibles, se obtiene solamente de un 30 a un 50 % de gestaciones comparando a cuando no se congela, aunado al alto costo que tiene el equipo que se requiere para la congelación de embriones. Pero a pesar de las pérdidas, la congelación es a veces usada comercialmente, cuando no hay receptoras disponibles, siendo esto una gran ventaja, ya que los embriones congelados son los que esperan a la receptora. Este almacenamiento a largo plazo, es también conocido como preservación in vitro. (70, 73, 88, 105)

Otra forma de conservar y almacenar los embriones, es cuando estos son alojados en el oviducto y/ó útero ligado de las donadoras ó bien en oviductos ligados de una hembra de otra especie. Este almacenamiento y transporte biológico, es también conocido como preservación in vivo.

Desde hace 50 años, un grupo de científicos de Cambridge, fueron los primeros en demostrar que los embriones de oveja, se desarrollan normalmente en los oviductos de conejas pseudo preñadas ó en estro. Desde entonces se ha demostrado que los embriones no solo de oveja, sino de muchas especies como: ratón, liebre, bovino, cerdo, caballo, mono y cabra; pueden desarrollarse en los oviductos de conejas. (23, 73, 88, 105)

Seidel Jr., en 1981, menciona que los embriones continúan su desarrollo normalmente, cuando son almacenados en el oviducto de una coneja viva por 2 a 4 días. Además reporta, que los porcentajes de preñez obtenidos por esta técnica, fueron altos. Boland en 1984, no solo obtuvo porcentajes de gestación dentro del rango normal, si no que en ocasiones se obtuvieron porcentajes más altos, después de un período de alojamiento límite (2 a 3 días) en el oviducto de la coneja. Es-

tos porcentajes más elevados de gestación, parecen deberse al resultado de una selección más intensiva de los embriones, al momento de la transferencia, además de alguna substancia adquirida durante el almacenamiento en el oviducto. Además menciona que pueden existir algunas pérdidas de los embriones -- (15-30 %), en el oviducto, y que no todos los embriones pueden haberse desarrollado en el rango normal.

Otros usos adicionales de los oviductos de coneja son:

a) El oviducto, puede ser usado como posible medio de -- cultivo, para el almacenamiento a corto plazo de cápsulas de agar conteniendo embriones micromanipulados.

b) Hay unos reportes, acerca del uso de la coneja en relación a la fertilización de ovocitos de especies domésticas. Esto es, que el oviducto de coneja ha sido usado como sitio -- exógeno de fertilización. (25, 103)

Lo expuesto anteriormente, tiene como finalidad el almacenamiento y transporte ó bien el logro de un grado de desarrollo óptimo del embrión.

Este punto es importante, ya que durante los programas de transferencia, es frecuente obtener embriones que no se encuentran en el estadio apropiado para ser transferidos, sin embargo, si estos se colocan en un medio de cultivo adecuado, es posible que alcancen dicha etapa para poder ser aprovechados. Oliva en 1986, ratifica el punto anterior, mencionando -- que el desarrollo de métodos de almacenamiento de embriones, es un requerimiento primario antes de que la técnica de transferencia embrionaria sea aplicada, ya que elimina la necesidad de transferir los embriones inmediatamente y de tener -- gran número de receptoras en sincronía el mismo día de la recolección. (78, 88)

9. Transferencia embrionaria

Para ser transferidos ó sucederse la in ovulación, se pueden utilizar métodos simples para la introducción del embrión

dentro de la hembra receptora, que se encuentra en sincronía estral con la donadora, teniéndose en consideración la capacidad uterina de la hembra; esta última, se ve afectada por factores genéticos y por la edad de la hembra.

Hafez, 1974; citado por Rojas et. al., en 1978, en un estudio realizado en conejos, transfirió un gran número de embriones en los cuernos uterinos (en uno ó en ambos), encontrando que un cuerno uterino de coneja es capaz de desarrollar como máximo 8 fetos viables.

Por el contrario Adams, 1970; citado por Rojas et. al., en 1978, demostró y concluyó que son necesarios a lo menos 2 embriones, para evitar la regresión del cuerpo lúteo, que ocurre en la coneja aproximadamente el día 17 después del coito. Así como considerar el sitio de la transferencia, en relación con la etapa de desarrollo del embrión (al oviducto ó al útero). (19, 96, 113)

La utilización de un lugar de transferencia situado a poca distancia de la posición normal de desarrollo de un embrión, al momento de sucederse esta, se traduce como un porcentaje más elevado de concepción; ratificando este punto, Prado et. al., en 1985, en su trabajo concluyeron, que hay un efecto benéfico potencial al transferir al embrión lo más cercano posible a la punta del cuerno uterino. (91, 113)

Existen básicamente 2 métodos para lograr la transferencia de embriones:

9.1 Quirúrgico: de las vías de acceso quirúrgico, para la realización de la transferencia, se sugieren 2 técnicas:

9.1.1 Anestesia general, seguida de una cirugía en la línea medio ventral del abdomen.

9.1.2 Anestesia general, seguida de una incisión en un flanco (fosa paralumbar); aunque también pueden ser efectuadas a través de una incisión bilateral de los flancos. (96)

Posteriormente, de haber efectuado la laparotomía, se exteriorizará el tracto reproductor (cuerno ó cuernos uterinos), para que a través de una punción de la pared uterina, se haga la deposición del embrión en la luz.

La punción de la pared uterina, puede ser efectuada por medio de una tijera fina ó una aguja de punta roma. Si existiese pérdida excesiva de sangre, a efecto de la punción, -- puede hacerse un punto a nivel de serosa uterina.

También la pared uterina, puede ser atravesada directamente con una pipeta Pasteur con punta en bisel. (31, 96)

Otra forma de deposición embrionaria, asociado a cirugía, es por la canulación de las trompas de falopio u oviductos. Embriones de 65 horas de edad ó menores pueden ser ---- transferidos a los eviductos. (96)

Dentro de los cuidados que deben tenerse al llevar a cabo la transferencia, es tomar en cuenta el volúmen del medio en el cual estan suspendidos los embriones. El volúmen del medio debe ser muy pequeño (0.5 ml.); además de procurar no inyectar aire en el lumen del oviducto ó útero. (31, 96)

9.2 No Quirúrgico: con deposición del embrión en el --- cuerno ipsilateral al ó los cuerpos luteos presentes, teniendo cuidado de prevenir la introducción de microorganismos, ya que el ambiente endocrino que priva en el útero, es dominado por la influencia de progesterona. (49)

9.2.1 Por vía transcervical: este método es similar al de la inseminación artificial. Moler et. al., 1979, reportan en su trabajo con ratones, que los embriones recolectados fueron puestos en un tubo capilar modificado y transferidos a través del cervix dentro de cada cuerno uterino de una ratona sin anestésiar. Un espéculo de vidrio fué usado para facilitar la localización del cervix. (78, 80)

Rowe en 1979, comparó los porcentajes de gestación entre las dos formas de transferencia embrionaria, encontrando lo siguiente:

- Cuando los embriones eran transferidos quirúrgicamente, los porcentajes de gestación fueron de 71 a 77 %.

- Cuando la transferencia fué hecha por vía no quirúrgica, los porcentajes de gestación fueron del 36 %.

9.3 Transferencia embrionaria transabdominal: otro método por el cual puede lograrse la transferencia embrionaria, es a través del uso del laparoscopio, haciendo deposición del embrión en la luz uterina, dentro del primer tercio del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo.

Schiewe et. al., en 1984, reconoce a la laparoscopia, como un procedimiento quirúrgico menor y que posee un papel relevante en la investigación biomédica.

El acceso directo a el útero de la hembra, para la colección y transferencia embrionaria, clásicamente ha sido efectuado a través de una laparatomía; aunque repetidas laparatomías y el manejo excesivo del tracto reproductor, pueden traumatizar los tejidos e incrementar la incidencia de adherencias abdominales, disminuyendo así el potencial de uso y longevidad de las receptoras. Es por esto que la laparoscopia debido a: su naturaleza intrusiva menor, sitio de incisión e incidencia de infecciones bacterianas pequeñas ó menores, menor deshidratación tisular y escasa formación de adherencias, puede plantearse como uno de los métodos alternativos, para conseguir la transferencia embrionaria. (51, 100)

10. Evaluación de la transferencia.

Esperando un tiempo prudente, se hace la evaluación del éxito de la transferencia, realizando el diagnóstico de preñez. En conejas esto se logra al palpar a las receptoras el día 18 de la gestación, para detectar el desarrollo de los embriones. (96, 97)

A pesar de que los principios generales de la transferencia embrionaria son los mismos para todas las especies mamíferas, cada especie tiene sus propias diferencias, que solo estudios persistentes podrán descubrir. (54)

OBJETIVOS

1. La elaboración de este trabajo, tiene como finalidad el plantear, desarrollar, evaluar y promover un modelo experimental de instrumentación y comprobación biológica del método más práctico y económico de la transferencia de embriones a nivel de práctica de laboratorio, de la asignatura de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la U.N.A.M.. Teniendo como contexto principal, el proporcionar un entrenamiento teórico-práctico (con mayor énfasis en lo práctico), a los miembros del departamento de reproducción animal e inseminación artificial y a los futuros médicos veterinarios que cursan esta asignatura; haciendo presentaciones demostrativas del modelo experimental (con la intervención académico-alumnos). Ya que es importante, que dentro de la formación profesional se incluya la difusión y enseñanza de los métodos y procedimientos, veterinarios y zootécnicos más modernos y funcionales, como lo es la transferencia de embriones.

2. Que este modelo planteado, pueda ser utilizado en futuros estudios y experimentos de fecundación, conservación y transferencia de embriones, estudios de superovulación y evaluación de ovocitos, estudios de sistemas de cultivo, crecimiento y procesos de diferenciación embrionaria; cuyos resultados pudiesen extrapolarse ó compararse, a los de otras especies domésticas productivas.

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se realizo en las instalaciones del laboratorio de Reproducción Animal e Inseminación Artificial de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, para lo cual se utilizo el siguiente material:

Animales.

2 conejas

2 conejos

Las conejas que se utilizaron, una de ellas fué de color blanco y la otra de color negro. Esto con la finalidad de hacer los resultados más evidentes. Por ejemplo: crias blancas nacidas de una hembra negra. Estas tuvieron un peso promedio de 2.5 a 3.5 kg., y con los requisitos referidos en la introducción para donadoras y receptoras.

Los machos fueron de una fertilidad probada, de color blanco y con un peso promedio de 3.5 a 4 kg.

Alimento.

Se uso un promedio de 250 gr. de alimento balanceado comercial al 17 % de proteína, por coneja al día. Y se suministro agua "ad libitum".

Durante la gestación y lactancia, la dieta habitual de las conejas se suplemento con zanahorias.

Alojamiento.

Las conejas se alojaron en una jaula para conejos doble, esta conto con sus respectivos bebederos, comederos y charollas. A temperatura y luz ambiental.

Los machos se mantuvieron en jaulas individuales, bajo las condiciones imperantes en el área del modulo de cunicultura en la F.E.S.- C.

Material de cirugía.

- 1 cuchillo de necropsias
 - 2 mangos de bisturí del número 4
 - 2 hojas de bisturí del número 20 ó 22
 - 4 pinzas de mosquito (2 rectas y 2 curvas)
 - 4 pinzas de hemostasis Mayo (2 rectas y 2 curvas)
 - 4 pinzas para fijar campos operatorios
 - 2 tijeras de punta roma (1 recta y 1 curva)
 - 1 tijera Metzenbauer
 - 2 pinzas de disección (1 recta y 1 con diente de ratón)
 - 2 hojas de rasurar
 - 1 porta agujas Mayo
 - 1 aguja de sutura de punta roma del número 20
 - 1 tijera de punta aguda.
 - 1 sobre de catgut atraumático crómico del número 00
 - 1 mt. de seda del número 00 ó 0
 - 2 agujas de sutura de medio círculo del número 20 traumáticas
 - 2 lamparas de cirugía (pedestal)
 - 2 pares de guantes de cirugía
 - 2 juegos de batas quirúrgicas
 - 1 juego de campos quirúrgicos
 - 4 cubrebocas desechables
 - 4 gorros quirúrgicos desechables
- Algodón y gasas

Material de laboratorio.

- 2 jeringas desechables de 20 ml. ó 3 jeringas de 5 ml.
- 1 caja de Petri de 200 ml., de vidrio
- 8 cajas de Petri de 100 ml., cuadrículadas (1 cm²); desechables.
- 3 cánulas de plástico, de 2 mm. de diametro interior, y de 20 cm. de largo (Venoset verde)

Continua...

- 1 aguja para inyección del número 22
- 1 aguja "Punzocat", del número 17 ó 18
- 2 matraces de Erlenmeyer de 100 ml.
- 2 matraces de Erlenmeyer de 250 ml.
- 2 microscopios estereoscópicos
- 1 microscopio óptico
- 1 porta objetos concavo
- 2 jeringas insulínicas c/aguja
- 5 pipetas Pasteur
- 1 estufa bacteriológica (37°C)
- 1 baño maría (37°C)
- 1 mesa de cirugía
- 1 tabla de madera
- 3 paños de algodón.

Material biológico.

- 1 frasco de 1000 U.I. de gonadotropina sérica de la yegua preñada (P.M.S.G.), "Foligon"; Lab. Serva.
- 1 frasco de 2500 U.I. de gonadotropina coriónica humana (H.C.G.), "Gonadotropina coriónica humana"; Lab. Loeffler.
- 1 lto. de solución Hartman; Lab. Abbot.
- 300 a 400 ml. de suero sanguíneo de coneja ó de bovino, inactivado a 56°C por 30 minutos.
- 1 frasco de propiopromazina, "Combelen"; Lab. Bayer.
- 1 Frasco de pentobarbital sódico, "Anestestal"; Lab. Norden.
- 2 frascos de penicilina G sódica de 800 000 U.I., "Penprocilina"; Lab. Lakeside.

Soluciones.

- 100 ml. de sol. de yodo al 5 %
- 100 ml. de sol. de benzal (dilución uso quirúrgico)
- 100 ml. de sol. de jabón quirúrgico.

Material didáctico.

Mesas de laboratorio
36 bancos
1 Pizarrón
1 caja de gises de colores
1 proyector de diapositivas
Diapositivas.

La metodología con la que se trabajo, es la que a continuación se describe:

a) Plática general .

En esta, se expuso los marcos teóricos y de referencia, con apoyo del material didáctico.

b) Selección de donadoras y receptoras.

Se analizaron los factores de peso, estado de salud, estado reproductivo y nutricional, para la selección de estas y su repercusión sobre los resultados de la técnica.

c) Superovulación.

Este punto es posible, que hubiese sido suprimido, debido a que la coneja, es una especie politoca, por lo que tiene ó posee una ovulación múltiple (8 a 9 óvulos liberados en promedio, por coneja).

Pero por razones didácticas, si se llevo a cabo.

El método que se siguió fué el propuesto por Hafez en -- 1978, el cual recomienda la aplicación de 100 a 150 U.I. de P.M.S.G., por vía intramuscular y de 66 a 72 horas después, se aplico por vía intravenosa de 50 a 60 U.I. de H.C.G.

d) Detección de celos.

La detección del celo ó estro, se hizo a través de una apreciación visual de la vulva.

e) Fertilización.

Una vez logrado el esquema superovulatorio y detectado el estro, la hembra (donadora), fué fecundada por medio de --

monta natural (una ó dos montas con cada macho en un lapso de 10 a 15 minutos).

f) Sincronización estral.

La hembra receptora, se sincronizo con la donadora, a través de la aplicación de 50 U.I. de H.C.G., por vía intravenosa (vena marginal de la oreja), al momento que a la donadora se le dio la monta.

g) Recolección de los embriones.

Después de 4 a 5 días (el día 1 es el que le sigue al del servicio a la donadora), esta fué sacrificada (eutanasia), por el método de dislocación cervical.

La donadora fué desollada, desangrada y la cabeza y las patas le fueron retiradas al cuerpo, para dejar tan solo la canal cerrada. Posteriormente se hizo una incisión por línea media para la remoción del tracto genital (ovariorrectomía), previa desinfección con yodo al 5 % ó con una solución de benzal 1:1000, en la zona de la misma.

Se sugirió la utilización del método: animal (donadora), tranquilizado/anestesiado (sin sacrificio), para lograr este punto, pero por razones prácticas no se llevo a cabo.

Ya abierta, se hizo la escisión del aparato genital en su totalidad, tomando en cuenta que al hacer el corte a nivel cervical, este fué efectuado delante de la porción craneal del cervix, pinzando previa ó inmediatamente después del corte con unas pinzas hemostáticas Mayo rectas.

Al hacer el corte a nivel de ovarios, se pinzo con pinzas de mosquito rectas, ya sea el ligamento ovárico ó el hilio ovárico, procurando no dañar los oviductos al momento de realizar esta operación.

Antes de separar el aparato genital de la cavidad abdominal, se contaron los cuerpos hemorrágicos existentes en los ovarios, para tratar de determinar la cantidad de embriones que se pudieran encontrar en los lavados.

Se removio el aparato genital de la cavidad abdominal a una caja de Petri de 200 ml. de capacidad, con 20 a 30 ml. de solución Hartman a 37°C., manteniendo la posición de éste, para no perder su identidad.

Posteriormente se procedio a hacer los lavados del aparato genital, a través de oviducto en dirección al cervix. Para facilitar la tarea de la canulación y lavado del aparato genital, se recomienda eliminar el tejido conjuntivo y grasa que rodea al útero y oviducto.

El líquido 6 medio de lavado que se utilizo, se inyecta a una presión suficiente para provocar una leve distensión -- del tracto, arrastrando así los embriones que pudiesen estar adosados a su pared interna. Este lavado se logro a través de la canulación del oviducto por medio de un tubo 6 cánula de polietileno de 20 cm. de largo y con un diámetro interior de 2 mm., insertado en el infundíbulo y fijado por medio de una pinza (mosquito curva); para evitar que la pinza obstruya el paso del medio, se incluyo dentro del tubo, un "alma" de acero (aguja del No. 22), que permita el pasar del mismo.

Los lavados se hicieron por duplicado, y cada lavado fué puesto en una caja de Petri de 100 ml., identificada y cuadrada. Se lavo primeramente la totalidad del tracto, y después se lavo a los oviductos y al útero por separado.

La solución de lavado fué solución Hartman al 10 % de -- suero sanguíneo de conejo 6 bovino, inactivado a 56°C. por -- 30', en un baño maría.

h) Identificación y evaluación de los embriones.

Se dio el manejo adecuado a los líquidos 6 medio recolectado, esto es, evitar la luz solar excesiva y evitar la contaminación, además y de gran importancia fue el mantener el medio recolectado a 37°C. (constante). Las cajas de Petri con el medio recolectado se observaron bajo el microscopio estereoscópico para localizar a los embriones, y una vez localiza

Se removio el aparato genital de la cavidad abdominal a una caja de Petri de 200 ml. de capacidad, con 20 a 30 ml. de solución Hartman a 37°C., manteniendo la posición de éste, para no perder su identidad.

Posteriormente se procedio a hacer los lavados del aparato genital, a través de oviducto en dirección al cervix. Para facilitar la tarea de la canulación y lavado del aparato genital, se recomienda eliminar el tejido conjuntivo y grasa que rodea al útero y oviducto.

El líquido ó medio de lavado que se utilizo, se inyectora a una presión suficiente para provocar una leve distensión -- del tracto, arrastrando así los embriones que pudiesen estar adosados a su pared interna. Este lavado se logro a través de la canulación del oviducto por medio de un tubo ó cánula de polietileno de 20 cm. de largo y con un diámetro interior de 2 mm., insertado en el infundíbulo y fijado por medio de una pinza (mosquito curva); para evitar que la pinza obstruya el paso del medio, se incluyo dentro del tubo, un "alma" de acero (aguja del No. 22), que permita el pasar del mismo.

Los lavados se hicieron por duplicado, y cada lavado fué puesto en una caja de Petri de 100 ml., identificada y cuadrada. Se lavo primeramente la totalidad del tracto, y después se lavo a los oviductos y al útero por separado.

La solución de lavado fué solución Hartman al 10 % de -- suero sanguíneo de conejo ó bovino, inactivado a 56°C. por -- 30', en un baño maría.

h) Identificación y evaluación de los embriones.

Se dio el manejo adecuado a los líquidos ó medio recolectado, esto es, evitar la luz solar excesiva y evitar la contaminación, además y de gran importancia fue el mantener el medio recolectado a 37°C. (constante). Las cajas de Petri con el medio recolectado se observaron bajo el microscopio estereoscópico para localizar a los embriones, y una vez localiza

dos, se aislaron con pipetas Pasteur y se colocaron en otra caja de Petri con solución Hartman al 25 % de suero sanguíneo, y posteriormente se colocaron en porta objetos con fondo concavo, para ser observados y evaluados en un microscopio óptico a 40 X (medio al 25 % y a una temperatura de 37°C.)

i) Transferencia de embriones.

La receptora se tranquilizo con una inyección de clor--hidrato de propiopromazina (Combelen), a una dosis de 0.2 ml./kg. , esperando el efecto aproximadamente de 10 a 15 minutos; posteriormente, se anestesió con pentobarbital sódico (Aneste--sal), a una dosis de 28 mg./kg., esto es aproximadamente 1.5-ml. del producto a una concentración de 6.3 %, de los cuales 0.75 ml. se administraron rápidamente y el resto a razón de 0.2 ml./min. , por vía intravenosa, hasta inducir la aneste--sia a un plano quirúrgico.

Posteriormente se hizo una incisión por la línea media, -previo rasurado y desinfección, para exponer el tracto geni--tal (laparotomía). Se diseco dicho aparato, para facilitar la deposición de los embriones en el lugar deseado.

Ya habiendo localizado el punto ó zona de transferencia, se punciono este con una aguja de punta roma para facilitar -la introducción de la cánula conteniendo los embriones. Otra forma de facilitar esta entrada, es haciendo un pequeño corte, que involucre, serosa, muscular y mucosa endometrial.

La deposición de los embriones se hizo en forma lenta y -con poco volúmen de líquido ó medio, evitando el introducir -burbujas de aire en el lumen uterino.

Se dejo que los cuernos uterinos tomen su posición nor--mal y se suturo con catgut (peritoneo/muscular) e hilo seda - (piel). Se procuro el darle los cuidados post-operatorios ade--cuados (aplicación de antibioticos parenterales).

A los 18 dias se evaluo el éxito del transplante, hacien--do una palpación por vía abdominal.

CONCLUSIONES

1. La inducción, recolección y transferencia de embriones en coneja, pueden ser efectuadas con un alto porcentaje de éxito, a través de los métodos descritos en este trabajo.
2. El método más práctico, para la recolección de los embriones en la coneja, fué logrado a través de una hembra (donadora), que fué sacrificada por dislocación cervical, y que más tarde se le hizo una ovariohisterectomía total.
Posteriormente se sometio a todo el tracto genital -- (de oviductos a cervix), a una serie de lavados con una solución Hartman adicionada con 10 % de suero -- sanguíneo de conejo ó bovino inactivado por temperatura, esta solución se utilizo a 37°C . Y se finalizo con el lavado posterior de oviductos y útero por separado con la misma solución.
3. Un punto que se considero, que es de vital importancia para el buen resultado de la técnica, es el mantener el medio y los embriones a una temperatura constante (37°C). Esto se mejoro mucho al trabajar los -- lavados (cajas de Petri), sobre paños de algodón entibiados (37°C), cambiandolos constantemente, mientras se reciba este. Para así evitar el cambio de temperatura tan brusco, entre la estufa bacteriológica (37°C) y lo frio de las mesas de laboratorio.
4. Dos inovaciones, fueron de gran uso práctico para el mejor desempeño de este método:
 - a). Inclusión de una "alma" de acero dentro de el tubo de polietileno, que va insertado en la fimbria ovi

ductal, y que es sostenido con unas pinzas hemostáticas y una gasa, al momento de hacer los lavados, evitándose así que el paso del medio de lavado se vea interrumpido por la presión de las pinzas sobre un tubo sin esta innovación. Además, con esto se evito que asíse de un reflujo del medio entre el oviducto y el tubo al momento de inyectar el medio.

b). La otra innovación, fué la del uso de una cánula -- (Punzocat), insertada a nivel de la unión útero-tubárica en útero, haciendo los lavados en dirección al cervix. Esta forma de lavado puede recomendarse a partir de los 4 ó 5 días post-coito en la coneja, a sabiendas que los embriones ya estan en cavidad uterina; ó bien puede utilizarse esta vía cuando exista dificultad para canalizar el oviducto.

5. Se sugiere, tomar en consideración en forma muy importante dadas las experiencias prácticas, el palpar a -- las conejas, tanto a la donadora como a la receptora, a los 15 días de haberlas recibido, para evitar desagradables contratiempos.
6. La finalidad didáctica de este trabajo, fué cubierta -- en forma satisfactoria, ya que se comprendio desde un punto de vista más real la transferencia de embriones, por el alumnado. Además se considero haber cumplido -- con los objetivos biológicos planteados, para este trabajo

ANEXOS

I. Fisiología reproductiva de la coneja.

El conejo doméstico, es derivado de el conejo europeo -- (Oryctolagus cuniculus), de el orden Lagomorfa. Este orden incluye: liebres, conejos y pikas.

La mayoría de las razas de conejos, son más pequeñas que las liebres y tienen menos desarrollados los miembros pelvianos. Los conejos nacen sin pelo y con los ojos cerrados, mientras que las liebres nacen con pelo y con los ojos abiertos.

El conejo (Oryctolagus cuniculus), posee 44 cromosomas y la liebre (Lepus sp.), posee 48; no habiendo por demás una relación filogenéticamente cercana, tal como las apariencias externas lo sugieren.

Hay aproximadamente 70 variedades de conejos, los cuales varían en color, peso corporal adulto (1 a 7 kg.), y largo de oreja (5 a 30 cm.).

a). Pubertad.

Las diferentes razas de conejos, alcanzan la pubertad y la madurez sexual a diferentes edades. Algunos autores mencionan, que la pubertad aparece dependiendo de la raza, las estaciones y el estado nutricional, a los 100 ó 110 días en promedio.

Algunas conejas dentro de una raza, se desarrollan más tempranamente que los machos. Es por esto, que las hembras -- tienden a copular 1 ó 2 veces antes de ser capaces de ovular; por lo que las montas deberán retrasarse, hasta que estas alcancen su talla normal para la raza y edad.

Algunas conejas se reproducen adecuadamente, hasta los 5 ó 6 años de edad, pero el tamaño de la camada generalmente declina después de los 3 años de edad. Los machos permanecen

reproductivamente activos por un máximo de 5 a 6 años, dependiendo de la individualidad, manejo y la frecuencia de las cópulas. (7, 51)

b). Temporada de apareamiento.

Los conejos salvajes, muestran un periodo definido de -- anestro y experimentan variaciones estacionales en su capacidad reproductiva. Entre los conejos domésticos, la duración -- del anestro, de colonia a colonia y entre individuos varia -- también. Algunas hembras y machos, son fértiles a través del -- año, pero la mayoría exhibe un anestro por 1 ó 2 meses. A pe -- sar de esto, los conejos domésticos también manifiestan, pa -- trones estacionales de su actividad reproductiva.

Los patrones estacionales de apareamiento, estan influen -- ciados por la raza de los conejos, y la localidad.

c). Estro.

Las conejas no muestran ciclos estrales regulares a pe -- sar de existir un cierto ritmo en su receptividad sexual.

Bajo condiciones favorables , la coneja muestra signos -- de estro por largos períodos, durante los cuales, los folícu -- los ováricos están en continuo desarrollo y regresión, mante -- niendo un número constante y adecuado para la ovulación. Si -- la hembra no se aparea, los folículos en el ovario permanecen -- grandes y activos por 12 a 16 días. Ellos entonces entran en -- regresión y nuevos folículos en crecimiento los remplazan.

Folículos activos, estarán consecuentemente presentes en -- todo momento durante la época de apareamiento, excepto quizás, -- en los períodos de transición , cuando un nuevo grupo de folí -- culos este creciendo y el viejo este en regresión.

Una hembra puede no mostrar receptividad sexual. cuando -- esta débil, lactando ó tiene un pobre estado nutricional, de -- bido a esto el desarrollo folicular esta suspendido.

Existen variaciones individuales en el grado de recepti -- vidad sexual, que ocurren en conejas no gestantes. En ocasio --

nes, la hembra puede rechazar la cópula ó rechazar un macho e inmediatamente aceptar a otro. La coneja puede aceptar por una vez a un macho, pero rechazarlo en una segunda vez.

Los signos de estro son más difíciles de definir en la coneja, más que en otros mamíferos con ciclos estrales típicos. La receptividad sexual en la hembra, esta indicada ó -- caracterizada por la presencia de una vulva congestionada, de color púrpura y húmeda, intranquilidad, trata de juntarse ó pegarse a la reja y restrega su barbilla en las paredes de la jaula ó en el equipo. (51)

d). Cópula.

Cuando la coneja esta sexualmente receptiva, ella adopta una posición de monta, levantando sus cuartos posteriores para permitir la cópula. El macho se mueve muy rápido, la monta y descansa su cabeza en su flanco ó lomo. El entonces efectua de 8 a 12 movimientos de cópula en forma rápida, para lograrla intromisión y eyacular. La acometida copulatoria es tan vigorosa, que el macho cae hacia atras ó a un lado y puede emitir un llanto característico.

El llanto es atribuible a una indicación de dolor y puede provenir de la hembra ó del macho.

El macho puede volver a copular de nuevo, frecuentemente en un minuto.

Una substancia gelatinosa en el eyaculado a menudo forma un tapón vaginal, el cual es expelido pocos minutos después de la cópula. (51)

e). Ovulación.

La coneja, como el hurón y algunos otros mustélidos, lagata y la musaraña, no ovulan espontaneamente. La ovulación ocurre de 10 a 15 hrs. después de la cópula ó después de algún otro estímulo, por ejemplo: la inyección de L.H. ó sales de cobre y cadmio, estimulación eléctrica de la cabeza ó de la región lumbar de la columna vertebral ó el orgasmo induci-

do por contacto con otras hembras. Sin embargo la ovulación puede no ser usualmente provocada por estimulación mecánica del cervix, como ocurre en la gata.

En las conejas, la ovulación puede llegar a fallar de un 20 a un 25 %, después de la cópula, probablemente esto debido a una deficiencia de L.H., en la glándula pituitaria.

La ovulación puede ser también inducida por gonadotropinas ó factores de liberación de gonadotropinas (G.N.R.H.). - Muchas de estas preparaciones, varían considerablemente en potencia y rango de dosis

La coneja puede aceptar al macho en cualquier momento durante la gestación ó pseudogestación, excepto por un corto período de 30 a 40 horas después de ocurrir el primer apareamiento. La fertilización puede ocurrir en cualquiera de los casos, si una segunda ovulación ocurre a 2 ó 3 días de la primera, ó cercano al fin de la pseudogestación hay cópula.

La fertilización no ocurre en presencia de un cuerpo luteo activo, probablemente debido a una falla en el transporte espermático y/o inhibición de la capacitación espermática en un útero progestacional.

6 horas después de ocurrir la ovulación, los cigotos empiezan a ser cubiertos con una capa de mucina, pudiendo no ser fertilizados después de esto. (7, 51, 96, 97)

f) Gestación.

La gestación dura de 30 a 33 días en el 98 % de los casos; ocasionalmente es de 29 ó 35 días. En casos de gestaciones prolongadas, el tamaño de la camada es pequeño y puede contener una ó dos crias anormalmente grandes ó juvenes prematuros.

La palpación de los fetos en desarrollo in utero, es un método rápido y acertado para la determinación de gestación.

De los 12 a los 14 días de gestación, los fetos se pueden sentir como "canicas", estos son fácilmente distinguibles

al deslizar entre el dedo pulgar y los demás dedos, parte de la cavidad abdominal posterior, en una dirección de atrás -- hacia adelante, con una ligera presión. Si se ejerce demasiada presión, pueden producirse magulladuras y hasta ruptura de las paredes del útero, resultando en una condición tóxica ó aborto.

En casos de duda, la palpación deberá ser repetida algunos días después. Es más difícil de distinguir entre el desarrollo de los fetos y los órganos digestivos después del día 14 de gestación.

La gestación puede ser también confirmada a los 24 días después de la cópula, por comparación del espesor (aumentado) de las glándulas mamarias, entre la coneja gestante y una no gestante. La confirmación por rayos X, es posible después -- del día 11 de gestación. (51, 97)

g) Pseudogestación.

La pseudopreñez puede ser resultado de una cópula este-- rril, ó de una inyección de L.H., ó de la estimulación causada cuando una de las conejas monta a otra ó cuando una coneja -- monta a una de sus crías. La pseudopreñez dura de 16 a 17 --- días; tiempo durante el cual la coneja no puede concebir.

Si estas hembras son mantenidas en grupo, deberán ser se-- paradas y puestas en jaulas individuales, cuando menos 16 --- días antes de iniciar los apareamientos.

Al final de la pseudogestación, la coneja puede arrancar se pelo de su cuerpo e intentará hacer un nido.

El cuerpo lúteo secreta progesterona, durante la pseudo-- preñez, causando crecimiento del útero y las glándulas mama-- rias. (51)

h). Parto.

El parto, depende de dos factores:

- Caída ó disminución de progesterona, a nivel miome-- -- -- trial.

- Repentina liberación de oxitocina.

El largo de la gestación, bien puede depender de la vida media del cuerpo lúteo. Fuchs et. al.; citados por Hafez en - 1978, reportan que la causa de la repentina liberación de oxitocina, es desconocida, pero sugieren que la caída de progesterona a nivel de sistema nervioso central puede estar relacionada.

El consumo de alimento disminuye 2 a 3 días antes de que ocurra el parto. El parto generalmente ocurre durante la madrugada, este generalmente pasa inadvertido.

Las presentaciones anterior y posterior son normales, y usualmente no ocurren complicaciones al parto si los fetos son de un tamaño normal. Un parto eutósico, requiere de menos de 30 minutos, ocasionalmente puede haber 1 ó 2 crias anormalmente grandes; conforme va pariendo la coneja, esta lame y atiende a cada recién nacido.

El esquema de parto, a veces se rompe, por ejemplo: las crias pueden nacer con intervalos de muchas horas y a veces de días, por lo que esta recomendada la palpación de todas las conejas de un día de paridas, para evitar la retención fetal; en caso de ser necesario, la labor de parto puede ser inducida en las conejas, por el uso de 200 μ m. de oxitocina en 1 ml. de solución salina fisiológica, este tratamiento también puede ser aplicado a conejas que excedan, un período superior a los 34 días de gestación.

El tamaño de la camada varía de 1 a 22 crias (con un promedio de 8), dependiendo esto de la raza, nutrición, número de partos y ambiente. El tamaño de la camada va en aumento hasta los 3 años, y posteriormente disminuye.

Tan pronto como nacen las crias, la coneja devora la placenta y el cordón umbilical. Algunas conejas muestran una tendencia infanticida canibalística, por devorar el cordón umbilical, orejas, apéndices, cabeza y cualquier parte del cuerpo

de las crias. El canibalismo raramente ocurre después de que la madre ha cuidado a sus crias un día ó más. Este problema puede ser debido a factores hereditarios, a una ración inadecuada ó al nerviosismo de la coneja.

Asociado con el canibalismo, hay una tendencia a esparcir las crias fuera del nido. Estas actitudes son probablemente influenciadas por el ambiente, más que por la herencia. (51)

i). Lactación.

Las glándulas mamarias, se desarrollan rapidamente durante la última semana de gestación. Aunque la leche puede ser producida antes del alumbramiento, y estar goteando de las glándulas de conejas con alta producción; la bajada de la leche usualmente ocurre hasta el alumbramiento, esta puede ser estimulada por una inyección de prolactina.

Las conejas amamantan a sus crias, por solo pocos minutos al día, generalmente en la noche ó en la madrugada, sin hacer caso, de cuantas veces las crias intenten mamarle.

La cantidad de producción lactea, es de 160 a 200 gr., durante la primer camada, y de 170 a 220 gr., durante las subsecuentes camadas. La producción lactea alcanza su máximo a las 2 semanas post-parto, manteniendose alta por lo menos una semana, y entonces declinar durante la cuarta semana.

Una coneja, puede lactar por un período de 6 a 8 semanas, dependiendo de la dieta, número de partos, número de crias que este amamantando y a factores genéticos. La cantidad de leche producida, se incrementa en cierto porcentaje, conforme se incrementa el tamaño de la camada, pero este incremento no es constante. (51, 55)

II. Ventajas y desventajas del método de transferencia embrionaria.

A partir de los primeros trabajos sobre transferencia -- embrionaria, se han propuesto una amplia gama de usos para esta técnica. Se afirma que puede ser útil, entre otras cosas, para:

- Expansión y mejoramiento genético rápido. (5, 11, 16, 17, 40, 47, 58, 59, 64, 78, 79, 103, 116)
- Aumento en la intensidad de selección. (6, 11, 28, 63, 78, 101, 103, 112)
- Almacenamiento y transporte barato, rápido y sencillo de genes. (5, 6, 16, 20, 36, 37, 47, 58, 59, 75, 78, 82, 85, 103, 105, 116)
- Introducción y adaptación de razas exóticas. (6, 11, 79, 103)
- Conservación de recursos genéticos. (11, 58, 59)
- Reproducción de hembras valiosas que tengan problemas reproductivos. (16, 28, 79, 101, 103)
- Control de problemas sanitarios al permitir la difusión de material genético sin exigir el transporte de los padres. (39, 42, 43, 79, 80, 90, 103)
- Estudio de las interacciones genético-ambientales, materno-fetales y feto-fetales. (79, 103)
- Producción de gemelos idénticos por medio de la partición de blastómeros con microcirugía. (13, 20, 22, 25, 26, 29, 48, 54, 59, 62, 70, 75, 78, 89, 101, 103, 110)
- Inducción de gestaciones gemelares en ganado productor de carne. (6, 25, 37, 47, 58, 59, 78, 79, 95, 112)
- Obtención de crias hembras con el sexaje de embriones. (13, 22, 29, 35, 36, 37, 58, 59, 70, 75, 78, 103)
- Reducción del intervalo entre generaciones mediante la fertilización in vitro de ovocitos pre-púberes. (5, 20,

- 22, 29, 59, 78, 101, 103)
- Combinación de genomas intra e interespecies con la -- producción de quimeras. (13, 20, 27, 70, 78, 79)
 - Implantación de genes descables por medio de la inge-- niería genética. (22, 70, 78, 111)
 - Obtención de machos superiores en mayor cantidad para la inseminación artificial. (59)
 - Clonación. (13, 29, 54, 59, 70, 78, 79)
 - Aumento del número de crías obtenidas por hembra. (11, 28, 47, 59, 94, 101, 103)

Mucho se ha escrito acerca de las grandes ventajas que - puede llegar a tener la explotación masiva de la técnica de - transferencia de embriones. Asi mismo, dicha técnica cierta-- mente ha despertado el entusiasmo de muchos criadores progre-- sistas, que ven con agrado los avances científicos que pueden redituuar en el mejoramiento de su explotación. Pero también - es cierto que faltan información y estudios acerca de las des-- ventajas que encierra en si misma dicha técnica. (46)

Algunas de estas son:

- No es conveniente hacer la selección del hato con base en las hembras. (46)
- En el presente, la transferencia de embriones es econo-- micamente factible solo para animales muy valiosos. (101)
- Otra desventaja, es el futuro de las características - reproductivas de la donadora. Por razones desconocidas, a veces las técnicas quirúrgicas producen adherencias-- en los órganos internos. (6, 101)
- La falla para obtener gestaciones, es la desventaja -- más común. (101)
- El gran reto de ésta técnica, es el mantener vivas a - las crías obtenidas. Hay disponibles seguros comercia-- les para cubrir a la receptora gestante y a la cría --

durante las primeras semanas de vida extrauterina.

(101)

- Ocasionalmente nacen gemelos, ya sea por división em-
brionaria ó por que 2 embriones fueron transferidos a
una sola receptora, cuando uno ó ambos embriones pare
cen ser anormales. Esto causa una gran desventaja al
parto y a la oportunidad de obtener free-martins ó --
distocias por ejemplo. (101)
- Desde el punto de vista económico, en esta técnica se
deben considerar los gastos referentes a la utiliza-
ción de hormonas naturales ó sintéticas sumamente ca-
ras, la utilización de medios especiales de recolecci
ón y cultivo, el material especializado que se necesi-
ta para la recolección y transferencia de los embri--
ones, el microscopio esteroscópico, las cámaras de cul-
tivo especiales, y a todo esto debe sumarse el costo -
de la misma inseminación artificial ó de la monta di-
recta, que es necesaria para fertilizar los óvulos.
Aun contando con todos esos recursos, Franco en 1984, -
considera aún más importante el aspecto científico----
práctico; han aparecido en México artículos en algunas
publicaciones que señalan el alto porcentaje de exitos
alcanzados en la transferencia embrionaria, y es bien-
probable que dichos datos sean realmente fidedignos, -
pero, ¿ quiénes son los que han obtenido semejantes re-
sultados ?, nada menos que veterinarios y especialis-
tas mexicanos, que han dedicado muchos años al perfec-
cionamiento de sus técnicas, y sin duda han aportado -
valiosos conocimientos a nivel mundial en este campo.
Pero seamos realistas. Esos especialistas han contado-
con el apoyo de instituciones de investigación ó ense-
ñanza, y sus conócimientos y práctica los han obtenido
después de largos años de trabajo.

Si a nivel de ganadería nacional pretendiéramos, en algunas explotaciones ganaderas, practicar en forma rutinaria la transferencia embrionaria, necesitaríamos además de amplios recursos económicos, de personal altamente especializado, que realizara en forma verdaderamente eficiente su trabajo. Y con esto, el costo ya inflado por el equipo, se incrementaría enormemente.

(6, 46)

- La realidad actual en México es que la inseminación artificial, es mucho más práctica y económica que la --- transferencia de embriones, y hasta que no se demuestre lo contrario, mediante estudios económicos e investigaciones científicas bien profundas realizadas aquí en México, no conviene por el momento, hacer inversiones enfocadas a técnicas que no han demostrado actualmente ser verdaderamente prácticas y eficientes. (46)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams C.E., (1971); The fate of fertilized eggs ---- transferred to the uterus or oviduct during advancing pseudopregnancy in the rabbit.
J.Reprod.Fert. 26, 99-111
- 2.- Adams C.E., (1980); Retention and development of --- eggs transferred to the uterus at various ti--mes after ovulation in the rabbit.
J.Reprod.Fert. 60, 309-315
- 3.- Alcivar A.A., (1984); Superovulatory responses in -- F.S.H. or Pergonal treated heifers.
Therio. Vol. 22, No. 6
- 4.- Amstutz H.E., (1980); Bovine medicine and surgery.
American veterinary publications, Inc.
1040-1048 pp
- 5.- Anonimo; Superovulation and egg transfer
- 6.- Anonimo; Transplante de embriones de ganado suizo y cebú realizados en México.
- 7.- Anonimo; Transfert d' embryons chez la lapine.
- 8.- Archbald L.F., (1980); A surgical method for collec-ting canine embryos after induction of estrus- and ovulation with exogenous gonadotropins.
Vet. Med./Small animal clinician Feb.
- 9.- Armstrong D.T., (1983); Factors influencing succes - of embryo tranfer in sheep and goats.
Therio. Vol. 12 No. 4
- 10.- Arreguin A.A., (1985); Suplementos nutritivos para - el cultivo de embriones de rata.
Tesis U.N.A.M.
- 11.- Arreola B.J., (1984); Transferencia de embriones.
Cebú., Vol. 10 No. 5, Mayo, 28-31 pp.

- 12.- Asociación de criadores Holstein Friesian de México.,
(1979); Reglamento de inseminación artificial-
y trasplante de embriones.
Cap. VII.
- 13.- Asprón P.M.A., (1984); Microcirugía embrionaria.
Cebú., Vol. 10, No. 9., 39-42
- 14.- Asprón P.M.A., (1984); Desarrollo de embriones en bo-
vinos.
Cebú., Vol. 10, No. 12., 27-35 pp.
- 15.- Astiazarán J.R., (1985); Evaluación de la solución de
Hartman, como medio alternativo para la reco---
lección y transferencia de embriones de bovino.
Memorias XI congreso nacional de buiatría.
México.
- 16.- Austin C.R., (1972); Desarrollo embrionario y fetal.
Prensa medica mexicana, S.A., México. 35-37 pp.
- 17.- Avila G.J., (1980); Transferencia de embriones.
Ganadero. México., Vol. 5 No. 2. Abril.
- 18.- Bates R.D., (1985); Chemically defined and serum su-
pplemented media effects on mouse embryo deve-
lopment.
Therio. Vol. 23 No. 4. April.
- 19.- Beatty R.A., (1951); Transplantation of mouse eggs.
Nature. 168: 995
- 20.- Betteridge K.J., (1981); An historical look at em---
bryo transfer.
J.Reprod.Fert. 62, 1-13
- 21.- Bogan J.A., (1986); Bases farmacológicas de la medi-
cina en grandes especies.
Edit. Científica P.L.M., Cap. 13
- 22.- Bohemia., (1978); Biotecnología, un camino de inte-
gración y desarrollo para america latina.
Bohemia., No. 11. Marzo.

- 23.- Boland M.P., (1984); Use of rabbit oviduct as a ---- screening tool for viability of mammalian eggs. Therio. Vol. 21 No. 1
- 24.- Bon Durant R.H., (1986); Techniques of embryo trans-
fer in the the bovine.
Memorias del curso de aspectos reproductivos
de los bovinos productores de leche.
México, 12 al 14 de Mayo.
- 25.- Borges D.O., (1978); La magia veterinaria de Lubcs -
Holly.
Bohemia. No. 18 Mayo.
- 26.- Brackett B.G., (1984); Bovine twins resulting from -
in vitro fertilization.
Therio. Vol. 21, No. 1
- 27.- Brem G., (1984); Chimerism in cattle through micro-
surgical aggregation of morulae.
Therio. Vol. 22, No. 5
- 28.- Bulletin de l' elevage., (1984); Nouveautés en matie
re de recherche en physiologie de la reproducti
on ovine. No. 16, Trimestral.
- 29.- Cedillo A.O.L., (1985); Texto programado de la trans
ferencia embrionaria en bovinos.
Tesis. U.N.A.M.
- 30.- Chang M.C., (1949); Effects of heterologus sera on -
fertilized rabbit ova.
J.Gen.Physiol., 32: 291-300
- 31.- Chang M.C., (1950a); Transplantation of rabbit blas-
tocysts at late stage/probability of normal de-
velopment and viability at low temperatures.
Science. 111: 544-545.
- 32.- Chang M.C., (1983); My work on the transplantation -
of mamalian eggs.
Therio. Vol. 19 No. 3

- 33.- Clayton O., (1984); The first successful in vitro -- fertilization and embryo transfer in a non-hu-- man primate.
Therio. Vol. 21 No. 1
- 34.- Cole H.H., (1977); Reproduction in domestic animals. Academic Press. U.S.A., 3a. Ed., Cap. 11
- 35.- Comar J., (1986); Vache ou taureau, ainsi sexe-t---- il ?
Biofutur. Oct.
- 36.- Daniel J.C., (1978); Methods in mamalian reproducti-- on.
Academic Press Inc., 259-354 pp
- 37.- David J.S.E., (1977); Embryo transfer with particu-- lar reference to cattle.
British Vet. Assoc., London., 1-49 pp
- 38.- Derivaux J., (1978); Reproducción de los animales do mésticos.
Edit. Acribia., 467-476 pp. España.
- 39.- Douglas H.W.C., (1986); Status of disease transmissi on studies and their relationship to the inter-- national movement of bovine embryos.
Can.Vet.J. 27: 57-55
- 40.- Dracy A.E., (1953); The future of ova transfer.
Iowa state college.
J. of Science. Vol. 28 No. 1 Sept.
- 41.- Drost M., (1983); Embryo transfer in water buffalo.
Therio. Vol. 20, No. 5
- 42.- Eaglesome M.D., (1980); Embryo transfer: A discussi on on its potential for infectious disease con-- trol based on a review of studies on infection of gametes and early embryos by various agents.
Can.Vet.J. 21: 106-112 pp

- 43.- Ecuyer C.L., (1978); Embryo transfer in the canadian cattle industry: Canada's regulatory approach. Agriculture Canada Department.
- 44.- Flores G.J., (1980); Transferencia de óvulos fecundados.
Seminario de la asignatura de Reproducción Animal e Inseminación Artificial.
F.E.S.- C., U.N.A.M.
- 45.- Foote R.H., (1963); Ovulation rates and litter sizes in sexually receptive and nonreceptive artificially inseminated rabbits given varying dosages of L.H.
J. Reprod. Fert., 5 : 59-66
- 46.- Franco B.F., (1984); La transferencia de embriones - ¿ tiene futuro en México ?.
Cebú., Vol. 10 No. 10
- 47.- Fuentes V.O., (1982); Farmacología veterinaria.
U.N.A.M., 348-351 pp
- 48.- Gatica R., (1984); Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins.
Therio. Vol. 21 No. 4
- 49.- Greve T., (1980); Embryo Transplantation in cattle.
Acta Vet. Scand., 21: 26-33
- 50.- Gustafsson H., (1985); Characteristics of embryos -- from repeat breeder and virgin heifers.
Therio. Vol. 23 No. 3
- 51.- Hafez E.S.E., (1978); Reproduction and breeding techniques for laboratory animals.
Lea & Febiger Inc., U.S.A., Cap. 16
- 52.- Hafez E.S.E., (1980); Reproduction in farm animals.
Lea & Febiger Inc., U.S.A., 569-593 pp
- 53.- Hafez E.S.E., (1980); Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy.

- MTP Press Limited., U.S.A.
- 54.- Hahn J., (1984); The value of laboratory animal models in embryo transfer research.
Therio. Vol. 21 No. 1
- 55.- Harned M.A., (1969); Some postpartum reproductive phenomena in the domestic rabbit.
J. Anim. Science., 28, 785-788 pp
- 56.- Hernández V.M.A., (1985); Inducción a la superovulación en pequeños rumiantes.
Seminario de la maestría de producción animal: Ovinos y caprinos., Reproducción.
F.E.S.- C., U.N.A.M.
- 57.- Hoechst, Lab., (1981); Conceptal/Receptal.
Hoechst Lab., México.
- 58.- Información científica y tecnológica., (1980); Transplante de embriones de bovino, en México.
Vol. 11, No. 19/15. Abril.
- 59.- Jillella D., (1982); Embryo transfer technology and its application in developing countries.
F.A.O.
- 60.- Kennelly J.J., (1965); Superovulatory response of pre/ and post/ pubertal rabbits to commercially available gonadotrophins.
J. Reprod. Fert., 9: 177-188 pp
- 61.- Koch E., (1985); Early pregnancy factor: Biology and practical application.
Br. Vet. J. 139: 52-58 pp
- 62.- Lambeth V.A., (1983); Microsurgery on bovine embryos at the morulae stage to produce monozygotic twins calves.
Therio. Vol. 20 No. 1
- 63.- Land R.B., (1975); The possible use of superovulation

- on and embryo transfer in cattle to increase --
response to selection.
Anim. Prod. 21: 1-12 pp
- 64.- Leañez A., (1983); Aplicación de la tecnología em--
brionaria para la multiplicación de rebaños eli
tes.
Facultad de ciencias veterinarias
U.C.V., Maracay; Venezuela.
- 65.- Leañez A., (1983); Sincronización, superovulación y-
transplante de embriones en bovinos.
U.C.V., Maracay; Venezuela.
- 66.- Lindner G.M., (1983); Bovine embryo morphology and -
evaluation.
Therio. Vol. 20 No. 4
- 67.- Lopez M., (1983); Hormonas.
Ed. Albatros. Argentina. 147-148 pp
- 68.- Marshall D.P.J.; Commercial embryo-transfers in ca--
ttle.
N.Z.Vet.J., 26: 92-95
- 69.- Martin P.A., (1983); Commercial embryo transfer in -
swine.
Therio. Vol. 19, No. 1
- 70.- Massip A., (1984); Transfert d' embryons dans 1' es-
pece bovine et perspectives d' avenir.
Ann. Med. Vet., 128: 305-315 pp
- 71.- Maurer R.R., (1968); Repeated superovulation follo--
wing administration of exogenous gonadotrophins
in dutch belted rabbits.
J.Reprod. Fert., 15: 93-102
- 72.- Maurer R.R., (1971); Maternal ageing and embryonic -
mortality in the rabbit.
J.Reprod. Fert., 25: 329-341 pp
- 73.- Maurer R.R., (1976); Storage of mammalian oocytes --

- and embryos: a review.
Can. J. Anim. Sci., 56: 131-145 pp
- 74.- Mc. Donald L.E., (1978); Reproducción y endocrinología veterinarias.
Ed. Interamericana. México.
- 75.- Mc. Donald G.K.; Current embryo transfer technology: The practitioner's view.
Emtech Genetics Ltd., Canada.
- 76.- Mc. Gowan R.M., (1984); Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG). I.
Therio. Vol. 22 No. 1
- 77.- Mc. Gowan R.M., (1985); Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG). II.
Therio. Vol. 24 No. 2
- 78.- Memorias del primer curso de actualización-teórico-demonstrativo. Transferencia de embriones en bovinos.
I.N.I.P., (1985)
- 79.- Merck Sharp and Dohme., (1980); Manual de veterinaria.
Merck Sharp and Dohme Inc.
- 80.- Moler T.L., (1979); A simple technique for nonsurgical embryo transfer in mice.
Lab. Anim. Science.
- 81.- Monke D.V., (1986); El virus de la leucosis bovina, no se transmite por semen ni por embriones.
J. Am. Vet. Med. Asoc. 4: 123-131 pp
- 82.- Moore N.W., (1979); Culture, storage and transfer of sheep embryos.
Sheep Breeding. 2 th. Ed., London.
- 83.- Morrow D.A., (1980); Current therapy in theriogenology.
W.B. Saunders Comp. U.S.A., 69-73 pp

- 84.- Naciff R., Vertiz B., (1986); Ensayo teórico-prácti
co para la transferencia de embriones, aplica
do a conejos.
Seminario de la asignatura de Reproducción Ani
mal e I.A.
F.E.S.- C., U.N.A.M.
- 85.- Nakagata N., (1980); Normal young after transfer of
frozen/thawed 2-cell mouse embryos obtained by
fertilization in vitro.
Jpn. J. Zootech. Sci., 51(10), 740-744 pp.
- 86.- Newcomb R., (1978); Non surgical recovery of bovine-
embryos.
Vet. Rec., 102: 414-417 pp.
- 87.- Nieto A.M.A., (1984); Atlas de embriones en estado -
de preimplantación.
Tesis. F.E.S.- C., U.N.A.M.
- 88.- Oliva C., (1986); Almacenamiento de embriones en ra
tas ovariectomizadas.
Tesis. F.E.S.- C., U.N.A.M.
- 89.- Ozil J.P., (1983); Production of identical twins by
bisection of blastocysts in the cow.
J. Reprod. Fert., 69: 463-468 pp
- 90.- Pig International., (1980); Embryo transfer-the-way-
ahead.
February, England.
- 91.- Prado Delgado A.R., (1985); Comparación de la efica
cia de dos instrumentos para transferencia no -
quirúrgica de hemiembriones bovinos.
Memorias del XI congreso de buiatria. México.
- 92.- Prather R.S., (1984); The effect of hydrogen ion con
centration on the freeze-thaw survival of mouse
embryos.
Therio. Vol. 21 No. 4

- 93.- Pugh A.A.O., (1980); Bovine embryo recovery by fil-
tration on non surgical flushing.
Therio. 13: 281-285 pp
- 94.- Randal J., (1981); Breeding the perfect cow.
Science. Nov.
- 95.- Rodríguez A.M., (1986); Uso de la transferencia de -
embriones e inseminación artificial en la in---
ducción de gestaciones gemelares en ganado en--
castado con cebú.
Reunión de investigaciones pecuarias en México.
I.N.I.P.
- 96.- Rojas O.P., (1978); Transferencia de embriones en co
nejos, ovejas y vacas.
Pontificia Universidad Católica de Chile., San-
tiago de Chile, Chile. Tesis.
- 97.- Romero M., (1983); Instrumentación y comprobación --
biológica del manejo de células haploides y di-
ploides en el trasplante de embriones de cone-
ja.
Tesis. U.A.M.- X.
- 98.- Rowe R.F., (1979); Embryo transfer in cattle: Nonsur
gical collection techniques.
Am. J. Vet. Res., Vol. 41 No. 1
- 99.- Sanchez Z.J.D., (1986); Recuperación y clasificación
de óvulos y embriones ovinos y caprinos de órga
nos genitales, obtenidos en el rastro municipal
de Tlalnepantla.
Tesis. F.E.S.- C., U.N.A.M.
- 100.- Schiewe M.C., (1984); Laparoscopic embryo transfer -
in domestic sheep: A preliminary study.
Therio. Vol. 23 No. 6
- 101.- Seidel G.E., (1975); Embryo transfer.
Charolais Bull-o-Gram., Apr/May.

- 102.- Seidel G.E. Jr., (1975); Embryo transfer III: Embryo recovery.
Charolais Bull-o-Gram., Jun/July, U.S.A.
- 103.- Seidel G.E. Jr., (1981); Superovulation and embryo transfer in cattle.
Science., Vol. 211, 23 Jan.
- 104.- Shaver E.L., (1970); The chromosome complement of -- blastocysts from rabbits injected with various doses of H.C.G., before ovulation.
J. Reprod. Fert., 23, 335-337
- 105.- Shea B.F., (1977); Pregnancies following long distance transport and transfer of frozen bovine embryos.
Can. J. Anim. Sci., 57, 801-802 pp
- 106.- Staples R.E., (1967); Behavioural induction of ovulation in the oestrus rabbit.
J. Reprod. Fert., 13: 429-435 pp
- 107.- Tervit H.R., (1981); Embryo transfer and artificial-insemination of goats.
Proc. Ruakura Farmers Conference. N. Zeland.
- 108.- Trejo G.A., (1972); Ensayo en la colección de ovulos en animales de laboratorio y en bovinos.
I.N.I.P. s/publicar.
- 109.- Vasquez R.R., (1985); Conservación de embriones de ratas a bajas temperaturas (4°C)
Tesis. F.E.S.-C., U.N.A.M.
- 110.- Voelkel S.A., (1984); Tasas de preñez consiguientes a trasplantes no quirúrgicos de embriones bovinos bisectados.
Memorias del X Congreso Mundial de Reproducción e I.A., Vol. I, Abstracts p. 251.
- 111.- Wagner T.E., (1984); The possibility of transgenic livestock.

- Therio. Vol. 21 No. 1
- 112.- Wilmut I., (1978); The value of embryo transfer to -
cattle breeding in Britain.
Vet. Rec. , 103: 107-110 pp
- 113.- Wilmut I., (1980); El trasplante de embriones en el
mejoramiento genético del ganado bovino.
Revista Mundial de Zootecnia. No. 35.
- 114.- Wilson W.D., (1985); Non-surgical embryo transfer --
and live birth in a llama.
Therio. Vol. 24 No. 2
- 115.- Willadsen S.M., (1979); Embryo transplantation in --
sheep.
The management and diseases of sheep., British-
Council and the Common Wealth Agricultural Bure
aux.
- 116.- Willet E.L., (1953); Egg transfer and superovulation
in farm animals.
American Found for the study of genetics.
U.S.A.
- 117.- Wollen S.T., (1985); Use and handling of drugs and -
biologicals in embryo transfer.
Therio. Vol. 23 No. 1
- 118.- Woods G.L., (1984); Collection and transfer of multi
ple embryos in the mare.
Therio. Vol. 21 No. 3