



PRÁCTICA 05

Recuperación, evaluación, clasificación y manipulación de embriones

Objetivos.

- Adiestrar en el manejo del protocolo de sincronización y superovulación ovárica
- Adiestrar en la recuperación de embriones post mortem
- Determinar el desarrollo y transporte embrionario en el tracto reproductivo de la coneja
- Reconocer partes del embrión de coneja y estado de desarrollo
- Adiestrar en la evaluación y clasificación de embriones según calidad y estado de desarrollo

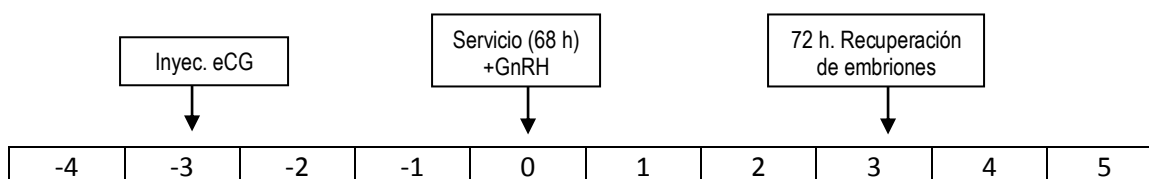
Materiales.

Los materiales necesarios para esta práctica son:

1. 4 conejas adultas, 1 macho; serán sincronizadas y superestimuladas el ovario con la aplicación de 50UI de PMSG e inducidas ovulación con 0.2 ml de GnRH.
2. Folligon 1000 UI, Conceptal (1 frasco) y alimento de conejas
3. Bisturí (04 unid), Bandeja (01 unid), Pinzas (02 unid), aguja 18G, solución Ringer (1 lt), Placas de 100 mm (3 unid), jeringa de 10ml (2 unid)
4. Guantes quirúrgicos (1 par / alumno)
5. Papel Toalla (3 rollo / grupo)

Metodología.

Las conejas serán superestimuladas con eCG (Folligon[®]), con el siguiente protocolo





Programa de sincronización y superestimulación ovárica de conejas:

	Coneja 1	Coneja 2	Coneja 3	Coneja 4
Aplic. eCG 50 UI (i.m.)	23/04 pm	22/04 pm	01/05 pm	30/04 pm
Monta natural (2 serv) + Aplic. 0.2 ml GnRH (Conceptal)	26/04 (am)	25/04 (am)	04/05 (am)	03/05 (am)
Recuperación de embriones	28/04 (am)	28/04 (am)	7/05 (pm)	7/05 (pm9)

Los embriones serán recuperados por lavado del oviducto y útero de hembras sacrificadas con estro sincronizado a 72 horas post inseminación. Se utilizará como medio de lavado 40 ml de solución Ringer suplementada con 5% suero bovino que será vertida por el infundíbulo con una jeringa de 20 cc y aguja punta roma 18G de 1 ½". Una placa petri en la parte baja de la unión útero-cervix será el depósito utilizado para recuperar el colectado, siguiendo al procedimiento realizado por Adams (1982) (ver Figura 1a).

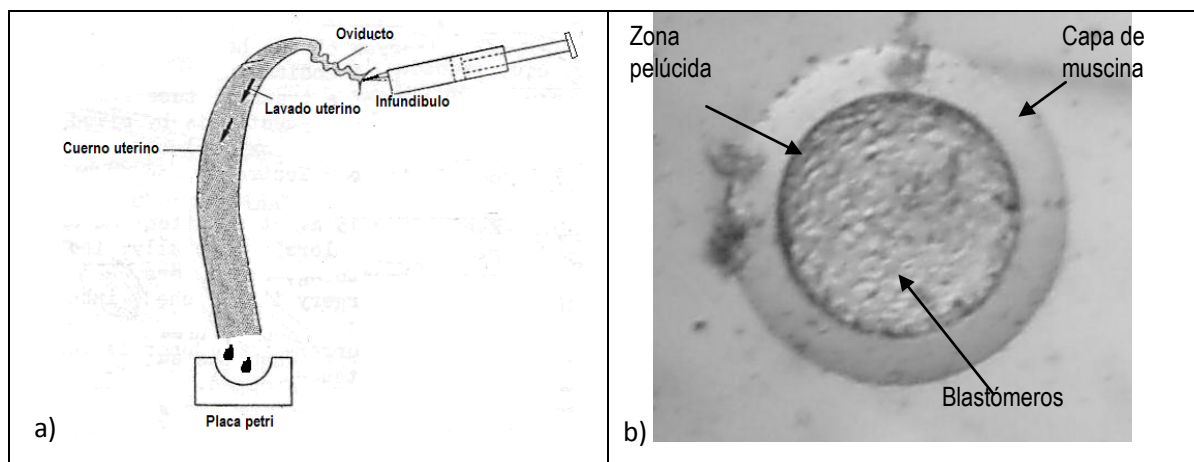


Figura 1: a) Método de lavado uterino para recuperar embriones (Adams, 1982) y b) Morfología de blastocisto de coneja.

El líquido recuperado será revisado bajo un estereoscopio a 20X en búsqueda de embriones y luego evaluados morfológicamente a 40X. Los embriones serán clasificados de acuerdo a criterios establecidos por Lindner y Wrigth (1983) quienes consideran.

V. Recuperación, evaluación, clasificación y manipulación de embriones

Estado de desarrollo: mórula, blastocisto temprano y blastocisto tardío;

Calidad del embrión: excelente, bueno, regular y pobre.

El alumno deberá completar la información siguiente y entregar junto con el cuestionario.

Tabla 1: Recuperación de embriones de conejas:

	Coneja 1	Coneja 2	Coneja 3	Coneja 3
Raza				
Edad				
# partos				
Peso vivo (kg)				
Fecha de monta				
Nro de servicios				
Fecha de recuperación				
Cuerpos lúteos OD y OI				
Folículos hemorrágicos OD y OI				
Ovas recuperadas				
Estado de desarrollo				
ovas
2 células
4 células
8 células
Mórula
Blastocisto temprano
Blastocisto
Blastocisto tardío
Blastocisto protuido
Calidad de embriones				
Excelente
Bueno
Regular
Pobre
Parámetros				
Tasa de recuperación
Tasa de fecundación
Embriones transferibles
Recomendaciones				



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Dinámica de la onda folicular del ovario

Adams (1999) afirma que en 95% de las vacas presenta 2 a 3 ondas foliculares en cada ciclo estral. Ciclos de una sola onda son reportadas en vaquillas antes de la pubertad y vacas durante el primer intervalo enterovulatorio después del parto. Ciclo con 4 ondas ocasionalmente observados en vacas *Bos indicus*.

La característica de una onda folicular viene dada por tres etapas reclutamiento, selección y dominancia. El reclutamiento se define como la iniciación del crecimiento de folículos gonadotropina dependientes (2 mm de diámetro) en ovejas y primates, pero el número de folículos en crecimiento es muy variable entre especies como es el caso de 50 en cerdas, 5 a 10 en vacas y 1 a 4 en yeguas. Todos los folículos que inician son reclutados son potencialmente capaz de ovular. La selección es un proceso muy complejo que comprende parámetros de tamaño y madurez. En todas las especies la selección se da aparentemente por el desarrollo de LH receptores por las células de la granulosa, lo cual se da cuando el folículo alcanza 4, 5 a 6, 8 y 25 mm de diámetro en ovejas, cerdas, vacas y yeguas respectivamente (Driancourt, 2001)

Factores que afectan a la superovulación

Los factores asociados con la administración de gonadotropinas exógenos que afectan la respuesta superovulatoria son; fuente, lote, actividad biológica de la hormona (Murphy et al., 1984)

Según Kanitz et al., (2002) la transferencia de embriones en vacunos ha sido realizado en programas de reproducción en todo el mundo por más de 20 años. La eficiencia de esta tecnología, progresos y costos dependen en gran medida de las respuestas de tratamientos superovulatorios y la inseminación artificial. Indudablemente las hormonas aplicadas y el esquema de inseminación, son los factores principales, por ende se centra en los aspectos siguientes del tratamiento superovulatorio con FSH: relaciones de la dosis-respuesta, bioactividad de la glicoproteína, FSH/Cociente de la LH, tiempo de la ovulación e inseminación, frecuencia de la administración del gonadotropina y de la población folicular a la hora del uso del gonadotropina.

Desarrollo embrionario temprano

El ovocito es ovulado en la segunda metafase y no completa la meiosis hasta la interacción con el espermatozoide. En el bovino la ovulación se da aproximadamente a 24 de iniciado el estro y la primera división se lleva a cabo a 48 h., después del estro . Este ovocito fecundado o no, es una célula de 150-190 μm de diámetro, incluyendo la zona pelúcida ó membrana pelúcida (una capa glicoproteica) que tiene un grosor de 12 a 15 μm (Lindner and Wright, 1983).

Las primeras tres divisiones del embrión se denomina desarrollo (cleavaje), tal es así que hasta 8 células se les denomina estados de desarrollo (cleavage), durante estas etapas el embrión decrece en peso (Seidel, 1991).

Durante el estado de mórula, las células embrionarias cambian de formas esféricas a poligonales (este fenómeno se denomina compactación). Durante la compactación, uniones especializadas hacen que las células se pueden comunicar con otras. La compactación es un excelente signo de que los embriones están desarrollando normalmente; la perdida de compactación a 6 días después del estro en vacunos indica desarrollo retardado (Seidel, 1991).

La mórula en desarrollo, internamente forma un cavidad (blastocelo) por gasto de energía al bombardear liquido entre las células, La formación del blastocisto, también es indicativo de continuidad de desarrollo normal del embrión. La no formación de blastocelo a 7-8 días después del estro, significa retardado desarrollo (Seidel, 1991). En el ratón y probablemente en el hombre la cavidad del blastocisto se inicia a formar cuando están presentes más de 20 a 30 células y el momento de la implantación se inicia cuando el blastocisto contiene más de 100 células. En coneja la formación de blastocisto se inicia cerca de tres divisiones más tarde que en el ratón, mientras que el blastocisto maduro contiene varios cientos de células y mide 3 a 4 mm de diámetro. El momento en el que la cavidad aparece no está relacionada con el tamaño del embrión (Austin and Short, 1982).

- Adams C. E., (1982) Mammalian egg transfer. Ed. Boca de Raton Florida. United States, pp 242.
- Adams G.P., (1999) Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants, J. Reprod. Fertil. Suppl. 54 (1999) 17–32.
- Austin C.R. and Short R.V. (1982) Reproduction in mammals. Book 2: Embryonic and fetal development. Second edition. University Cambridge.
- Driancourt M.A. (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in faro animals implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.
- Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, Pohland R. (2002) Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev.* 2002 Nov-Dec;42(6):587-99.
- Lindner G.M. and Wrigth R.W. (1983) Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 20(4): 407-416.
- Murphy B.D., Mapletoft R.J., Manns J., Humphrey W.D. (1984), Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response, *Theriogenology* 21: 117–125.
- Seidel G. E. Jr. (1991) Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal Production and Health. Paper 77, pp 164

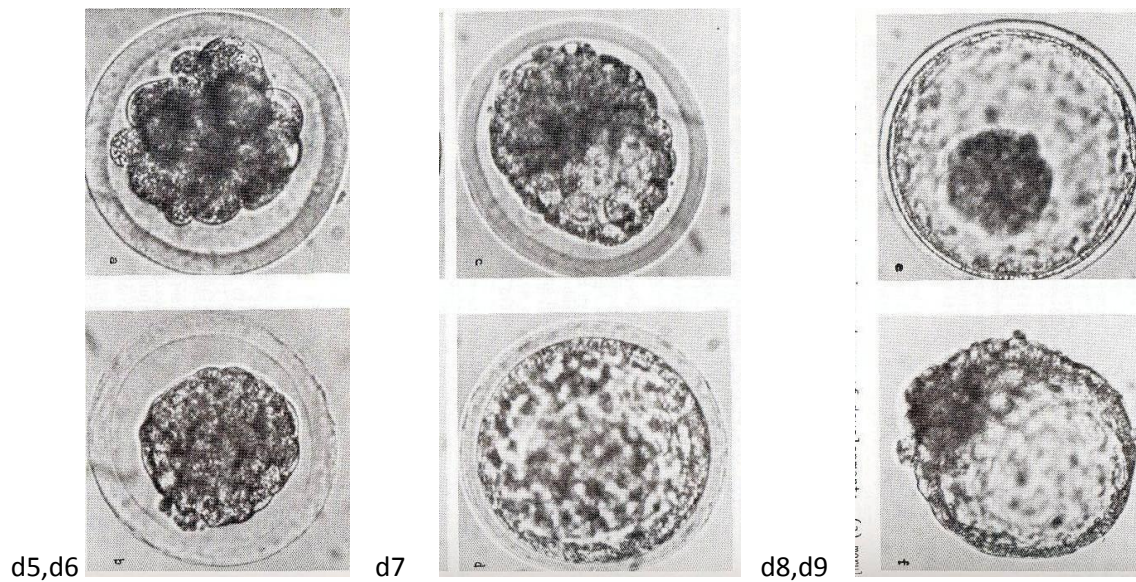


Figura 2: Embriones bovinos en diferentes estados de desarrollo (460X), (Lindner and Wright, 1983).
Morula, Blastocistos

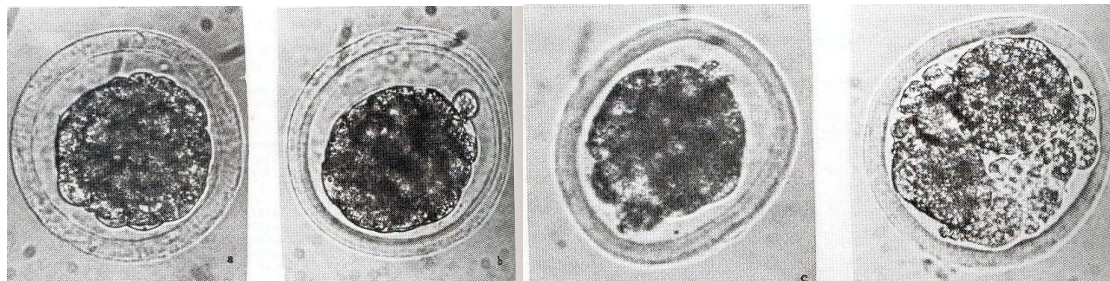


Figura 3: Cuatro mórulas compactas (embrión bovino, excelente, bueno, regular y malo, respectivamente) (460X), (Lindner and Wright, 1983)

Errores en la fecundación

- **Polispermia**
 - Varios espermatozoides penetran en ovocito y la formación de múltiple pronúcleos masculinos y un pronúcleo femenino
 - En invertebrados el exceso de espermatozoides es eliminado porque el centríolo espermático contribuye para la primera división del embrionaria
 - En mamíferos, el centríolo del espermatozoide no es esencial y el desarrollo puede continuar si dos espermatozoides penetran, el cigoto triploide puede desarrollarse hasta que ocurre una falla en el desarrollo temprano
 - Puede ocurrir en los ovocitos envejecidos debido a la falla o retardo del bloqueo a polispermia
- **Poliginia**
 - Varios pronúcleos femeninos y un pronúcleo masculino
 - No ocurre normalmente en la naturaleza
 - Se puede producir por supresión de la eliminación del segundo corpúsculo polar
- **Androgenote**
 - La unión de dos pronúcleos masculinos para formar el embrión
 - No ocurre en la naturaleza, pudiera ser el resultado del intercambio pronuclear (manipulación del embrión in vitro)
- **Ginogenote**
 - La unión de dos pronúcleos femeninos para formar el embrión
 - No ocurre en la naturaleza, pero puede ser resultado de una activación artificial del ovocito (partenogénesis) y supresión de la eliminación del segundo corpúsculo polar
- **Partenogénesis**
 - Activación del ovocito y el desarrollo sin participación del espermatozoide

Estados de desarrollo en bovino (Tiempo relativo del inicio de estro, estro = 0 h o día 0)

- Fecundación (30 hr)
- Cigoto (34 hr) definido cuando el pronúcleo esta presente
- División
 - 2 cell (62 h, día 2)
 - 4 cell (75 h, día 3)
 - 8 cell (90 h, día 3)
 - 16 cell (120 h, día 4)
- Mórula (día 5-7) Cuando ocurre la compactación
- Blastocisto (día 7-10) tiene la cavidad llena de liquido, tiene la masa interna de células y el trofodermo
- Eclosión (día 9-11)

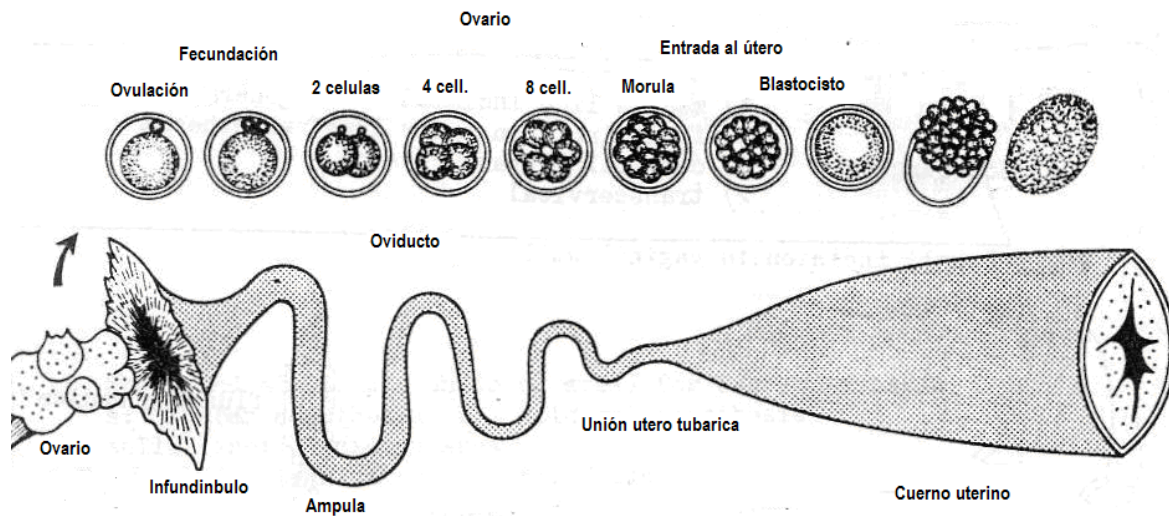


Figura 4: Desarrollo embrionario temprano del embrión de bovino y transporte en el tracto reproductivo

Cuestionario

1. Completar el cuadro del informe y concluir
2. ¿Cuál es la teoría de formación del blastocelo?
3. ¿Cuál es el tiempo del desarrollo embrionario temprano en ovino, coneja, marrana, humano, ratón y alpaca
4. ¿Cómo es el método de recuperación de embriones en cabras?
5. ¿Enumere el desarrollo histórico del éxito de la transferencia de embriones en mamíferos?