RENDIMIENTO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS EN EL PROGRAMA DE MULTIPLICACION DE UN REBAÑO CACHEMIRA

Cocero, M.J.[1]; López Sebastián, A.[1]; García López, M.[1]; González de Bulnes, A.[1]; Santiago Moreno, J.[1]; Ormazabal, J.J[2]; Reus, E[3].

[1]Area Reproducción Animal. CIT/INIA. Ctra. de La Coruña, Km. 5,900. 28040-Madrid. [2] IEPA. Aptdo. 13.33300. Villaviciosa (Asturias). [3] Excma. Diputación Provincial de Guadalajara.

INTRODUCCION

La mejora y simplificación tanto de los procedimientos utilizados en los programas de transferencia de embriones como en los sistemas de crioconservación, está conduciendo a que estas tecnologías lleguen a jugar un papel fundamental en el comercio internacional de especies domésticas. Aunque las tasas medias de gestación post-descongelación no son equivalentes a las obtenidas con la transferencia de embriones frescos y se requiere investigación adicional al respecto (Dobrinsky, 1996), en la actualidad se cuenta con técnicas estandarizadas cuyos rendimientos varían entre especies (Fahning y García, 1992) y la eficacia finalmente obtenida después de la transferencia depende de un gran número de factores, relativos tanto a las donantes y receptora, como al propio embrion (Ishwar y Memon, 1996). En este trabajo se aportan los rendimientos obtenidos en la aplicación de un programa de transferecia de embriones frescos y congelados, cuyo objetivo es la multiplicación de un rebaño importado de cabras cachemira.

MATERIAL Y METODOS

Se ha transferido un total de 92 embriones frescos y 104 embriones congelados a 45 y 56 receptoras respectivamente.

Embriones frescos

Los embriones tranferidos con un intervalo de 1 a 3 horas desde su extracción, procedían de 12 hembras estimuladas en 1 de las 4 experiencias de superovulación realizadas entre Septiembre de 1994 y Noviembre de 1995, siempre en época favorable.

Las donantes se han sincronizado con esponjas intravaginales de 45 mg de FGA (Intervet) mantenidas durante 16 días y una inyección de 0,5ml de $PGF_2 \alpha$ (Estrumate^R, Pittman-Moore) en el día 14, coincidiendo con la primera de las 8 inyecciónes de 1 ml de FSH ovina (Ovagen^R,ICP), administradas para inducir la superovulación.

La cubrición se realizó por monta controlada en el momento de aparición del celo y 12 e incluso 24 horas después de este, ó por inseminación artificial intrauterina con semen congelado a las 50 horas de la retirada de la esponja.

Los embriones fueron obtenidos por perfusión de los cuernos uterinos ipsilaterales a los ovarios que presentaron cuerpos lúteos, utilizando como medio de lavado PBS-Dulbeccos suplementado con 0,1% de BSA. Antes de la transferencia, los embriones fueron lavados en medio limpio consistente en PBS suplementado con 5% de suero de cabra inactivado (PBSS) y mantenidos a 3°C; durante este periodo se realizó la clasificación morfológica en 5 categorías (Wrigth y Ellington, 1995).

Embriones congelados

Los embriones importados de Escocia (104) habían sido congelados con una curva clásica de congelación, tras su crioprotección con ETG (Etilén-glicol) en 3 pasos de concentración creciente (0,5M:10 min.; 1M:10 min. y 1,5M:20 min.). Todos ellos habían sido calificados como excelentes ó buenos antes de su conservación.

La descongelación de las pajuelas se realizó durante 7 seg en aire y 25 seg en agua a 30°C; la retirada de crioprotector fue efectuada en 3 etapas de 10 min, incluyendo los embriones en solución 0,75M de ETG + 0,5M de Sacarosa en PBSS, después 0,5M de sacarosa en PBSS y finalmente en PBSS. Todos los embriones recuperados de las pajuelas fueron transferidos.

Transferencia

Las hembras receptoras fueron sincronizadas como las donantes, si bien las esponjas fueron retiradas 12 horas antes y se les aplicó en este momento una inyección intramuscular de 400 UI de PMSG. Antes de realizar la laparotomía media bajo anestesia general, para depositar los embriones en el tercio anterior del cuerno correspondiente al ovario con cuerpo luteo, se relizaron endoscopías para determinar la tasa de ovulación.

Análisis estadístico

Para la medida de la viabilidad de los embriones después de la transferencia directa ó tras su congelación, descongelación y transferencia, se han tomado como variables el número de receptoras que parieron del total de hembras transferidas (T.Gest.), el número de cabritos nacidos frente al de embriones transferidos (T Superv) y la prolificidad. El análisis estadístico de las variables estudiadas se realizó mediante la prueba de chi-cuadrado, utilizando la corrección de Yates cuando alguna de las frecuencias esperadas fué menor de 10.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las 4 experiencias de superovulación realizadas en las dos localidades de ubicación de los animales, se observan diferencias en la efectividad del trabajo realizado que sólo pueden ser debidas al estado corporal y sanitario de las hembras, ya que las condiciones de explotación son diferentes, mientras que todos los protocolos experimentales aplicados a donantes y receptoras han sido identicos.(cuadro 1)

Cuadro 1: Rendimiento de la transferencia de embriones frescos

ACTUACION	Nº DON	Nº RECEP	T. GEST	T. SUPERV	D. EFECT
A.Sept.94	3	7	43%	35%(5/14)	1
G.Nov.94	3	15	60%	43%(13/30)	3
A.Dic.94	3	19	47%	29%(11/38)	3
G.Nov.95	3	5	60%	50%(5/10)	2
TOTAL	**12**	**45**	**53%**	**37%(34/92)**	**9**

El rendimento medio alcanzado, tanto en tasa de gestación (53%) como en tasa de supervivencia (37%), con la transferencia de embriones frescos es algo inferior al aportado por otros autores (Ishwar y Memon,1996); este hecho puede ser debido a que en este trabajo se han transferido todos los embriones obtenidos, excluyendose únicamente los retrasados y los óvulos no fertilizados.

Cuadro 2: Eficacia global tras la transferencia de embriones frescos

ESTADIO	Nº.RECEP	T.GEST	T.SUPERV	PROLIF
Morulas	19	47.4%(9/12)	30.0%(12/40)	1.3
Blastos	26	57.7%(15/26)	42.3%(22/52)	1.5

Agrupando los resultados en función del estadío de desarollo que los embriones presentaban en el momento de su obtención y transferencia, (cuadro 2), se observa que no hay diferencias significativas entre mórulas y blastocistos al comparar los valores de cada una de las variables estudiadas; incluso no se llega a detectar tendencia a la significación en la diferencia

entre las tasas de supervivencia de ambos estadíos (30% vs 42%; P> 0.1). Estos resultados confirman los aportados por Armstrong y Evans (1983) y están en contraposición con los publicados por otros autores (Ishwar y Memon, 1996).

Cuadro 3: Rendimiento en la transferencia de embriones congelados.

ACTUACION	Nº DON	Nº RECEP	T.GEST	T.SUPERV	D.EFECT
A.Sept.94	5	9	44%	41.%(7/17)	3
G.Nov.94	5	10	90%	85%(17/20)	5
A.Sept.95	7	14	43%	28%(7/25)	4
A.Nov.95	3	17	29%	18%(6/33)	4
G.Nov.95		6	50%	33%(3/9)	3
TOTAL	**15**	**56**	**48%**	**38%(40/104)**	**12**

Con la transferencia de embriones congelados también se observan diferencias entre los resultados obtenidos en las distintas actuaciones,a pesar de mantener los mismos protocolos de trabajo tanto con los animales como con los embriones. Los valores medios obtenidos en tasa de gestación y de supervivencia (48,2% y 38,5%) son muy semejantes a los logrados con embriones frescos (53,3% y 37%), lo cuál es debido probablemente a que sólo se congelaron embriones excelentes y buenos, mientras que todos los obtenidos de las donantes superovuladas fueron utilizados para transferencia.

Cuadro 4: Eficacia global de la transferencia de embriones congelados

ESTADIO	Nº RECEP	T.GEST	T.SUPERV	PROLIF
Morulas	35	$31.4\%(11/35)_a$	$20.9\%(13/62)_a$	1.2_c
Blastos	21	$76.2\%(16/21)_b$	$64.3\%(27/42)_b$	1.7_d

a≠b:P<0,01; c≠d: P<0,05

Al contrario que con transferencia en fresco, los rendimientos obtenidos con embriones congelados muestran una gran dependencia del estadío de desarrollo en que se trabaje, ya que es altamente significativa (P < 0.01) la diferencia en los valores obtenidos entre mórulas y blastos, tanto en tasa de gestación (31,4% vs 76,2%9) como en supervivencia (20,9% vs 64,3%), lo que difiere de las observaciones sobre supervivencia in vivo aportadas por Le Gal y col. (1993).

BIBLIOGRAFIA

Armstrong, D.T., Evans, G. (1983) Theriogenology 19 (1): 31-42.
Dobrinsky, J.R. (1996). Theriogenology 45: 17-26.
Fahning, M.L y García, M.A. (1992) Cryobiology 29: 1-18.
Ishwar, A.K. y Memon, M.A. (1996) Small Rumin. Res.19: 35-43.
Le Gal, Baril, Vallet (1993) Theriogenology 40: 771-777.
Vallet, J.C.; Baril, G.; Loysel, C.; (1989) 5th Scientific Meeting of EETA, Lyon 1:186 (abstract).
Wright, R.W. y Ellington, J. (1995) Theriogenology 44: 1167-1189.