

EVALUACION Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

CUENCA, L.
M. Vet. Ejercicio Liberal

RODRIGUEZ, H.

M. Vet. MSC

Encargado del Servicio
de Reproducción del CIVET Rubino

Introducción

En la década del 70 se inició una etapa de cambios en la Reproducción animal que ampliaron sustancialmente el panorama de futuro de esta disciplina. Hoy, la transferencia de embriones es trabajo de rutina en muchos países del mundo —en Estados Unidos nacen 20.000 terneros al año mediante esta técnica—; no sólo como medio de multiplicar el material genético sino también como método de estudio de causas de infertilidad.

En conexión con la transferencia de embriones se desarrollan en la actualidad técnicas de congelación de embriones, de sexaje de los mismos y de separación de blastómeras. A no dudar, en los próximos años varias de estas técnicas serán de aplicación en gran escala. En el Uruguay, si bien debemos estar en condiciones de manejar esta nueva metodología, no debemos perder de vista que la prioridad de nuestra profesión debe ser la mejora de la eficiencia reproductiva y la difusión de la Inseminación Artificial y el control reproductivo.

Características de la vaca donante

Además de las características genéticas, el Veterinario deberá tener en cuenta que se obtienen mejores resultados con vacas donantes de buena fertilidad o sea sin historia de problemas reproductivos.

La transferencia de embriones puede ser dividida en tres etapas, a saber:

- Superovulación
- Recuperación y evaluación de embriones
- Transferencia

Superovulación

Se empieza el tratamiento de la vaca donante entre los días 9 y 13 del ciclo estral.

El siguiente cuadro, tomado de Schneider y Hahn (1979) esquematiza los dos métodos clásicos de superovulación: con PMSG, o con FSH Cuadro I. Actualmente es más usada la FSH, en la dosis indicada, o en dosis decrecientes en 5 días, que comienza con 5 mg. cada 12 horas el 1er. día, 4 mg. cada 12 horas el 2o. día, luego 3 mg. y finalmente 2 mg. los últimos dos días.

En vacas en lactación o vacas de carne de gran tamaño, se aumentan las dosis un 50%. En cuanto a la Prostaglandina, hay autores que comunican buenos resultados inyectándola a las 72 horas de iniciado el tratamiento de superovulación. La inseminación se hace a las 12 horas de detectado el celo, y se repite dos veces más a intervalos de 12 horas. Si el semen no es de muy alto precio se suele utilizar doble dosis. Es muy importante que el semen a utilizar sea de muy buena calidad biológica.

Normalmente, un 80 a 85% de las vacas fértiles responden al tratamiento de superovulación, y mantienen una buena respuesta por 3 tratamientos realizados a intervalos de 50–60 días. Los trabajos del Dr. Peter Elsdén de la Universidad del Estado de Colorado señalan como resultados promedio, 10 embriones colectados por superovulación, de los cuales 7 son aptos para transferir y de éstos se obtienen 3, 5 a 4 preñeces.

Cuadro I. Resultados de Recuperación no quirúrgica de vacas y vaquillonas superovuladas

No. de donantes c = vacas h = vaquillonas	No. de CL por animal $\bar{x} \pm SD$	No. de embriones por donante $\bar{x} \pm SD$ (rango)	Autor
15	-	6.8	Alexander (2)
21 h	14.3 \pm 2.1	7.6 \pm 1.6	NEWCOMB (35)
15	5	2.1	SREENAN (46)
24 c h	-	6.9	ELSDEN (10) BRAND (7)
25 c	-	4.9	
15 h	12.2 \pm 4.9	6.3 \pm 4.4	ROWE (41)
7 c	8.5	6.1 \pm 3.9	RASBECH (36)
39 c	8.9	4.1	GREVE (12)
29 c	9.2 \pm 7.5	6.3 \pm 6.1	GREVE (11)
14 h	22.3	8.1 \pm 5	LAMPETER (30)
42 c h	-	6.7	LAMPETER (27)
11	11.2	5.3 \pm 2.9	LAMPETER (29)
20 c	-	4.8	BAUMGARTNER (3)
26 c h	-	5.7	ROSELIUS (39)
14 c	-	5.6 \pm 4	HAHN (19)

Tomado de Schneider, U. y Hahn, J. (1979)

Recuperación NO QUIRURGICA de embriones

La técnica utilizada hasta 1975 incluía cirugía de la donante por la línea media y bajo anestesia total. Este método tiene el inconveniente de las adherencias causadas a nivel del aparato reproductor que pueden llevar a la esterilidad. Desde 1977 se han perfeccionado métodos no quirúrgicos de recolección que ofrecen buenos resultados.

La recolección se hace entre los días 6 a 8 a posteriori del celo inducido por la Prostaglandina. La vaca donante es mantenida en ayuno y privada de agua durante las 24 horas previas a la colección. Para la misma el animal es colocado en un cepo con su tren anterior elevado unos 30 centímetros —si se trata de vacas grandes— con el fin de facilitar la manipulación del útero.

Se palpan ovarios para estimar la respuesta al tratamiento superovulatorio; y se administran 5 c.c. de Procaína al 2% por vía epidural. Se lava y desinfecta la zona vulvar y perineal.

Luego se pasa a través del cérvix un dilatador cervical, cuyo diámetro es de 3 mm. en la punta y 8 mm. en su parte más ancha.

Inmediatamente se introduce por vía transcervical un catéter tipo Foley de 2 o 3 vías calibre 18 a 24 que posee un balón inflable cerca de su extremo y es guiado mediante un mandril en su interior. El catéter debe introducirse dentro de un cuerno uterino, de tal modo que el balón, al inflarse quede por delante de la bifurcación uterina, y así bloquee ese cuerno. (Figura 2)

La cantidad de aire a insuflar al balón es de 15 a 20 c.c. en vaquillonas y 20 a 25 c.c. en vacas, lo que debe hacerse lentamente para no dañar la mucosa uterina.

Se retira el mandril y se procede al "lavado" del cuerno.

El medio utilizado es Dulbecco modificado (Fosfato buffer salino, PBS) con el agregado de 1% de suero fetal

bovino y a 37°C de temperatura, que se coloca en frasco invertido a 1m. de altura sobre el lomo de la vaca. Un tubo de goma conecta el frasco con la entrada del catéter. (Figura 3)

Un total de 500 a 800 c.c. de medio son pasados por cada cuerno. La cantidad que pasa por vez se adecua al tamaño del útero, oscilando entre 50 a 150 c.c. La mano del operador controla por vía rectal la cantidad de líquido ingresado. La salida del líquido se hace también por gravedad hacia una probeta de 1 litro conectada por tubo de goma. La entrada y salida del líquido es dirigida por el operador mediante una pinza.

Otro método también utilizado, es por medio de jeringa que inyecta y extrae el líquido del útero.

Luego de terminada la perfusión de un cuerno se realiza la misma operación en el opuesto.

La probeta conteniendo el medio es colocada en estufa a 37°C durante 30 minutos para dejar decantar; luego se sifona la parte superior, dejando 150 c.c. que se observan en caja de Petri bajo estereolupa a 10 - 20 aumentos. El resto del medio se deja decantar nuevamente para ser observado mediante el mismo sistema.

Los embriones hallados son pasados mediante pipeta a un medio de cultivo similar, pero que contiene 20% de suero fetal bovino. Luego son clasificados por su morfología en aptos, no aptos y dudosos; los embriones aptos son transferidos en la tarde del día de recolección. En cuanto a los dudosos, permanecen en estufa a 37°C durante la noche, y los que continuaron su desarrollo son transferidos al día siguiente.

La viabilidad de los embriones se mantiene bien in vitro durante 24 y hasta 30 horas, luego desciende brusca-

mente. Este lapso ha permitido realizar exportaciones experimentales —en tubos a 37°— de Canadá a Europa y de Estados Unidos a México.

TRATAMIENTO DE SUPEROVULACION EN BOVINOS

Figura 1 — Tratamiento de superovulación en bovino usando PMSG o FSH. El tratamiento se inicia entre los días 9 y 13 del ciclo. La PGF₂ se administra 48 horas post iniciación del tratamiento con gonadotrofinas. (Según V. Schneider, U. y Hahn, J 1979)

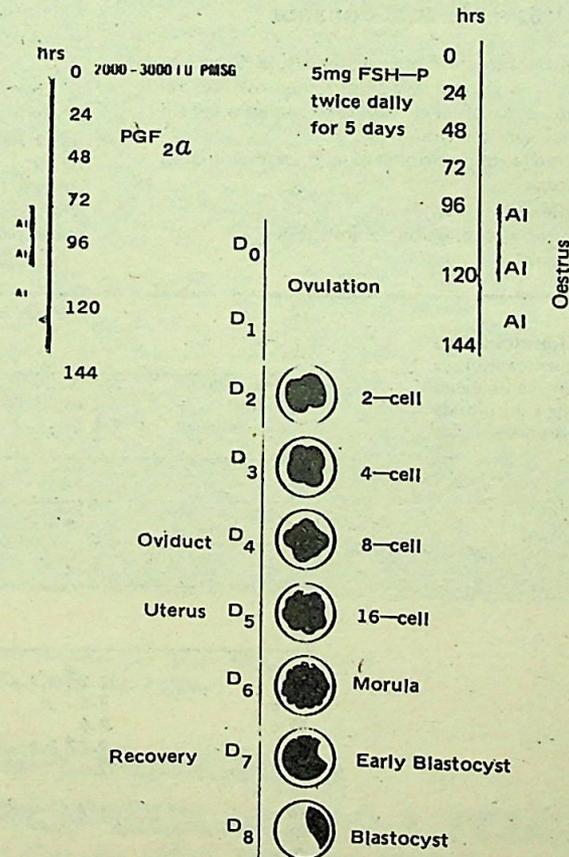


Fig. 2
Ubicación del catéter en el
cuerno uterino.

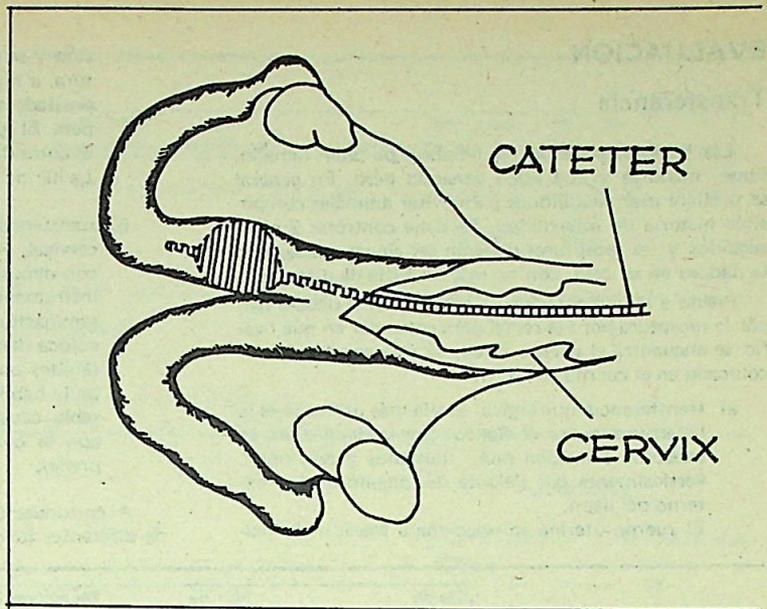
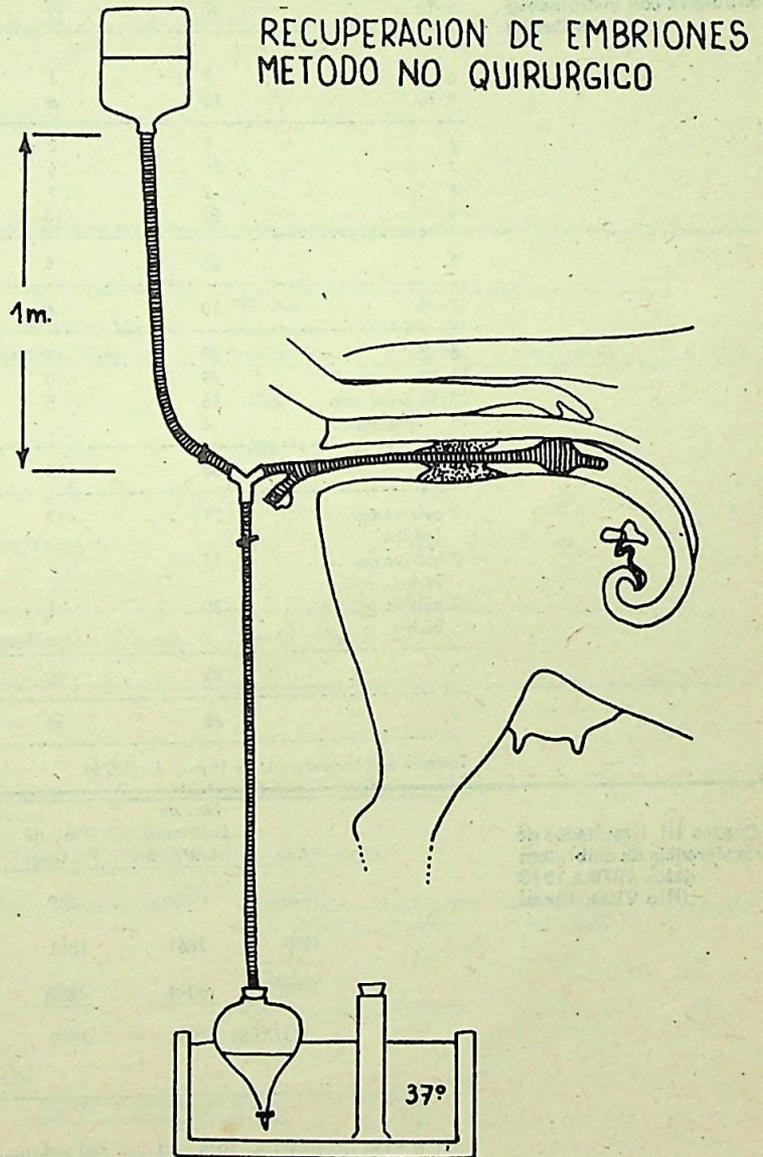


Fig. 3
Recuperación de embriones.
Método no quirúrgico.



EVALUACION

Transferencia

Las receptoras deben ser hembras de buen tamaño, sanas, maduras y que estén ganando peso. En general se prefiere usar vaquillonas para evitar animales con posible historia de infertilidad. Se debe controlar 2 celos seguidos y las receptoras deberán ser sincronizadas con la dadora en su celo, con no más de 1 día de diferencia.

Previo a la implantación de embriones, se deberá palpar la receptora por vía rectal para constatar en qué ovario se encuentra el cuerpo lúteo, ya que aquél debe ser colocado en el cuerno adyacente.

- a) transferencia quirúrgica: la vía más utilizada es la laparotomía por el flanco: previa depilación, se anestesia e inciden piel, músculos y peritoneo, verticalmente por delante del ángulo ántero externo del ileon.

El cuerno uterino se tracciona a través de la inci-

sión y se punciona con el ojo de una aguja de sutura, a nivel del tercio anterior. El embrión es depositado en la luz del mismo por medio de una pipeta. El total de medio introducido con el embrión es entre 0.1 a 0.2 c.c.

La herida se sutura en 2 planos.

- b) transferencia no quirúrgica: se realiza por vía trans-cervical, en forma similar a la inseminación, pero con deposición profunda en el cuerno uterino. El instrumento más utilizado es una pistola de inseminación similar a la de Cassou y el embrión se coloca dentro de una paillette. Los resultados obtenidos por este método depende en gran medida de la habilidad del operador, ya que es casi inevitable causar traumatismos a la mucosa uterina, con la consiguiente merma en el porcentaje de preñez.

A continuación se presentan cuadros de resultados de diferentes fuentes, con los varios métodos detallados.

Cuadro II. Resultados de transferencia no quirúrgica con instrumento de Cassou	Día de Transferencia	No. de Receptoras	Receptoras Preñadas		AUTOR
			No.	%	
	9-13	37	19	51	HEYMAN (23)
	6- 7	7	1	14	RENARD (38)
	9-10	12	6	50	
	6	9	2	22	TROUNSON (54)
	7	15	6	40	
	8	2	1	50	
	9	22	13	59	
	5	25	8	32	GREVE (13)
	7- 9	10	6	60	SREENAN (46)
	6- 8	32	12	37	BRAND (7)
	11-12	29	10	34	
	13-14 prexesado	16	5	31	
	15 prexesado	6	-	-	
	7- 8	33	10	30	GREVE (11)
	7 cultivo por 1-4 hrs.	27	17	63	HAHN (16)
	7 cultivo por 24 hrs.	11	5	46	
	7 cultivo por 36 hrs.	30	1	3	
	7	94	46	49	ROSELIUS (39)
	7	68	36	53	HAHN (18)

Tomado de Schneider, U. y Hahn, J. (1979)

Cuadro III. Resultados de transferencia de embriones desde 1976 a 1978 (Rio Vista, Texas)

Año	No. de		Porcentaje
	Embriones Transferidos	Preñeces	
1976	1959	1240	63
1977	2861	1851	65
1978 ^a	3094	1888	61
TOTALES	7914	4979	63

a - Los resultados de 1978 incluyen 568 embriones transferidos no quirúrgicamente, con un porcentaje menor de éxito (44%, 247 preñeces/568 embriones transferidos).- El resultado por vía quirúrgica fue 65% - 1641/2527.-

Tomado de Schneider H.J. et al (1980)

Cuadro IV. Respuesta de donantes a superovulación

No. de Tratamientos	Embriones Recuperados	No. Fertilizados	Porcentaje	Embriones Transferidos	No. de Preñeces	Porcentaje
519	9.95 ± 8.4	8.20 ± 7.55	82	5.96 ± 5.37	3.63 ± 5.37	61
TOTALES	5169	4257		3094	1881	

media ± desvío standard

Tomado de Schneider, H.J. et al (1980)

Cuadro V. Embriones recuperados de donantes no superovuladas

No. de intentos de recuperación	DONANTES	
	Sin infertilidad previa	Con infertilidad previa
-----	51	38
No. de embriones recuperados -----	36	4
% de éxito -----	71	11

Elsden P (1976)

Cuadro VI. Efecto de sincronización de las receptoras en porcentaje de preñez

Sincronización donante/receptora	No. de embriones transferidos	No. de preñeces	Porcentaje
- 12	475	312	66
0	1488	996	67
+ 12	593	362	61
TOTALES	2556	1670	65

Tomado de Schneider, H.J. et al , (1980)

Cuadro VII. Resultados de transferencia de embriones en condiciones de campo. T. Greve et. al 1979 (Dinamarca)

N = 103 vacas donantes
 Transferencia día 7
 112 superovulaciones - (2.400 U.I. PMSG día 9-13)
 En 20 vacas (18%) no se colectó (mala respuesta superovulatoria)
 En 13 vacas (11,6%) lavado de un solo cuerno

No. DONANTES	OVULACIONES \bar{x}	EMBRIONES COLECTADOS	EMBRIONES VIABLES	RECEPTORAS PREÑADAS	% DE PREÑEZ
92	11	6	3.3	1.65	50
		Transferencia NO QUIRURGICA		en vaquillonas en vacas	27 50

CONGELACION

Supervivencia post descongelación
 preñez por transferencia quirúrgica

80 - 85%
 48 - 52%

Cuadro VIII. Efecto de calidad del embrión en la tasa de preñez

CALIDAD DEL EMBRION	No. de Embriones Transferidos	No. de Preñeces	Porcentaje
Buena	1809	1272	70
Regular, pobre	694	380	55
TOTALES	2503	1652	66

Tomado de Schneider, H.J. et al (1980)

REFERENCIAS:

- Scheider Je, H.J. Castleberry, R.S, and Griffin J.L. Commercial aspects of bonne embryo transfer. *Thenogenology* (1980) - 13 - 1; (73-85).
- Elsden, R.P, Nelson, L.D. and Seidel Ja, G.E. Embryo transfer in fertile and infertile cows. *Thenogenology* (1979) - 11 - 1: (17 - 25)
- Betteridge, K.J. (1977) Summary of factors affecting success rate in singical embryo transfer. En: *Embryo Transfer in Farm Animals*. Ed. K.J. Betteridge.
- Elsden R.P., Master, J.F. and Seidel J.R., G.E. (1976) Non - surgiced recovery of bovine eggs. *Thenogenology* 6, (523-532).
- Schneider, U and Hahn, J. Bovine embryo transfer in Germany. *Thenogenology* (1979) 11-1: (63-80). Grefe, T and Lehn - Jensen Henkik Current Status of embryo transplanta hon in Denmark. *Thenogenology* (1979) 11 - 1: (99).
- Nelson, L.D., Seidel Jr. GE, Elsden, R.P. and Bowen, R.A. Superovulación of Cows using follide Stimulating hormone and Prostaglandin F2 *Thenogenology* (1979) - 11 - 1: (104).

EVALUACION DE EMBRIONES BOVINOS

RODRIGUEZ, H.
Dpto. de Reproducción Animal
C.I.VET - M.A.P.
D.V.M.Sc (Uppsala)

INTRODUCCION

El desarrollo temprano de los blastocistos bovinos en el momento habitual de transferencia -experimental o comercial- correspondiente a los 7 días postovulación es un proceso ciertamente crítico. Para sobrellevar un desarrollo posterior es necesario que la diferenciación celular del macizo celular interno y la capa trofoblástica, así como la formación del blastocele, ocurran. Ello es bien ostensible cuando tenemos datos numéricos de transferencias y número de gestaciones logradas correlacionados en forma positiva con una clasificación que aunque con claros resultados es pobre y arbitraria.

Diferentes técnicas, y diferentes criterios han sido empleados para valorar la futura viabilidad de los embriones como paso previo a su transferencia. Es el principal motivo de esta disertación hacer un sumario -breve- de las principales técnicas y metodologías utilizadas para la evaluación de embriones bovinos pre-transferencia, cuando se trate tanto de embriones recién colectados como de los conservados "in vitro" o sometidos al proceso de almacenamiento en condiciones de congelación.

BREVE RECORDATORIO MORFO-FISIOLOGICO

Tomando el día 0 como el día del estro en bovinos, el clivaje del cigoto comienza en el día 2 y desde allí se produce la segmentación hasta la aparición de una mórula en el día 6 al final del cual el embrión hace su entrada en la cavidad uterina. En el día 7, cuando ya comenzó el proceso de blastulación, con la diferenciación cada vez

más clara de trofoblasto y macizo celular interno, es cuando se realizan rutinariamente las colecciones no quirúrgicas por lavado de la cavidad uterina. De modo que este es el elemento celular que corresponde evaluar, el **blastocisto bovino** en sus diferentes grados de desarrollo, aún circunscripto dentro de su membrana pelúcida.

METODOLOGIA DE EVALUACION

Diferentes metodologías han sido seguidas, y dentro de ellas las que más han prosperado han sido las morfológicas, en las cuales toda la gama de parámetros posibles han sido tomados en cuenta, tales como la presencia o ausencia de zona pelúcida, la diferenciación grosera del botón embrionario, tamaño del embrión, etc. No obstante ello también se han desarrollado técnicas más refinadas como por ejemplo, las bioquímicas o fluorescentes, sobre las cuales volveremos más tarde.

De modo que, por considerarlas más próximas a nuestras posibilidades inmediatas, hemos de tratar con más detalle las técnicas morfológicas, sobre todo aquellas cuya necesidad de instrumental es mínima.

Muchos han sido los trabajos publicados respecto a la morfología de los blastocistos bovinos post colección (1, 2, 3, 4) y a partir de ellos puede clasificarlo al blastocisto de 7 días como **normales, anormales o degenerados** y **estadios intermedios o en proceso de degeneración** (5), a través de su evaluación bajo estereomicroscopio o microscopio de contraste de fase. Los blastocistos reconocidos como **normales**, son aquellos que muestran una clara diferenciación de las células trofoblásticas, del macizo celular interno y un blastocele expandido distinguible claramente. También se incluyen en este grupo aquellos blastocistos que no tienen un claro blastocele pero muestran una superficie regular de células trofoblásticas y que en el espacio perivitelino contienen únicamente 2 cuerpos polares (o 3) pero no otras células o detritus.

Aquellos blastocistos intermedios o en proceso de degeneración corresponden a los que muestran una morfología sin una clara diferenciación de las células trofoblásticas, el macizo celular interno y/o el blastocele. Aquellos blastocistos en los cuales la superficie del embrión presenta irregularidades y donde las células más