

periféricas no mostraban buenas interrelaciones topográficas, o células o detritus celulares en el espacio perivitelo, se incluyen en este tipo.

Por último, en cuanto a los blastocistos que muestran cambios degenerativos francos, se cuentan aquellos que presentan una zona pelúcida rota o con claros signos de degeneración celular, o incluso los que presentan blastómeros separados o de diferente tamaño o un bajo número de blastómeros.

Esta metodología fue testada (5) con excelentes resultados, escaso margen de error cuando el operador está entrenado y entre los tests realizados para verificar como coherente el criterio de calificación se realizaron mediciones diametrales varias, análisis morfológicos ultraestructurales (6, 7) y cromosómicos (8), etc; al cabo de los cuales se encontró como muy significativo, la diferencia entre número de células presentes en blastocistas normales y blastocistas degeneradas de 99 a 58, contra la no significancia del espesor de zona pelúcida o el diámetro blastocitario. Se deduce pues, que en base a la simple observación de los blastocistos de días 7, tomando como criterio clasificatorio la apariencia morfológica, especialmente dirigida al número de células y al grado de su organización histoarquitectural.

De cualquier manera, este criterio de clasificación permite predecir la posibilidad de desarrollo *in vitro* pero no ofrecen una estimación cierta sobre posterior desarrollo *in vivo*. La aplicación de criterios bioquímicos tales como la captación de Glucosa, desarrollada en blastocistos de 10-11 días *in vitro*, permite una clasificación de éstos en distintos grupos, presentando diferentes posibilidades de desarrollo *in vivo*.

Siguiendo estos parámetros bioquímicos, la selección de embriones pretransferencia ha considerado otras manifestaciones de la actividad metabólica embrionaria tales como la producción del activador del plasminógeno y la actividad de las hidrolasas (9).

Por otra parte, la viabilidad de embriones bovinos congelados y descongelados puede ser evaluada con un período de incubación de 3 a 5 minutos con colorantes fluorescentes, tales como el Fluorescein-diacetilo (FDA) y el dianudino-2-fenil-indol (DAPI). Los embriones que

mueren durante el proceso de congelación no muestran fluorescencia cuando se tratan con DAPI. Por el contrario, los embriones vivos muestran una fluorescencia positiva después del tratamiento con FDA, pero son negativos después de incubación con DAPI. Usando estos métodos, es viable la rápida y exacta determinación del número de blastómeros vivas y muertas. Estos embriones con reacciones parciales a estos colorantes muestran un desarrollo no muy avanzado. El tratamiento corto con los colorantes fluorescentes no influye en el desarrollo posterior de los embriones normales (10).

## REFERENCIAS

1. BOLAND, M. et al. (1978) Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology*, 10: 175-80.
2. ELSDEN, R. et al. (1978) Superovulating cows with FSH and PMSG. *Theriogenology*, 9: 17-26.
3. GREVE, T. et al. (1979) Morphological evaluation of bovine embryos recovered non-surgically from superovulated dairy cows on days 61/2 to 71/2. A field study. *A. Biol. Anim. Bloch. Biphys.* 19: 1599-1611.
4. HAMILTON, W. and LAING, J. (1946) Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. *J. Anat.* 80: 194-204.
5. LINARES, T. and KING, A. (1980) Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Theriogenology*, In Press.
6. LINARES, T. et al. (1980) The ultrastructure of blastocysts collected from virgin and repeat breeders: helpers. 9th. Int. Cong. Anim. Reprod. A.I. (Madrid) III:446.
7. LINARES, T. et al. (1980) Evaluation of morphology in 7 day old blastocyst. 9th. Int. Cong. Anim. Reprod. A. I. (Madrid) III: 448.
8. KING, W. A. et al. (1979) A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet. Sci. Commun.* 3: 51-56.
9. PHILLIPPON, A. et al. (1980) Check up of bovine embryo before transfer. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. III: 449.
10. SCHILLING, E. et al. (1980) Evaluation of deep frozen cattle embryos. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. (Madrid) III:463.

## CONGELACION DE EMBRIONES BOVINOS

En general, las técnicas han comprendido el uso de mórulas tardías y blastocistos, con la obtención de tasas de 30 a 44 % de embriones congelados que han desarrollado gestaciones posteriores.

Como medios más usados el Buffer Fosfato Dulbecco conteniendo ya sea 1.5M DimetilSulfóxido (DMSO) o 1.0M glicerol, han demostrado ser los mejores como medios de almacenamiento. La cristalización en el medio se induce automáticamente (Planner Omnifreezer R202/200R) a alrededor de -50°C con una velocidad promedio de 30°C/min, seguido por varios pasos diferentes de congelación y enfriamiento. Se sigue por un muy lento enfriamiento hasta -30 a -40°C y luego se hace

la transferencia inmediata y directa a N<sub>2</sub> líquido. Embriones enfriados y congelados de este modo (evitando formación de hielo intracelular) deben ser descongelados rápidamente para prevenir daño debido a crecimiento de hielo intracelular (1, 2). Siguiendo esta metodología se obtuvo el 44 % de sobrevida y éxito *in vivo* (21 gestaciones de 48 embriones congelados).

Rutinariamente, los embriones se congelan ya sea en ampollas de vidrio (1) o en pajuelas (Ministraws 3, 4) siendo las últimas una metodología más rápida y económica en muchos casos. En el momento, existen dos métodos standard (3), el método lento y el rápido (ver tabla I).

En ambos métodos, el DMSO, o el uso de glicerol al 10 % es indistinto y ha dado muy buenos resultados.

Aunque los resultados obtenidos son tanto mejores cuanto mejores los blastocistos a congelar (morfológicamente, por ej.), las menores irregularidades en morfología, como la reducción en número de células de la masa embrionaria, o falla de algunas células para participar en la compactación no han sido problema grave en la manutención de la viabilidad post congelación/reviviscencia, pero sólo en casos de mórulas tardías. En la medida que nos adelantamos más en el desarrollo (blastocistos y blastocistos elongados) la supervivencia es cada vez menor, probablemente debido a la mayor masa líquida en la cavidad blastular y a la mayor especialización celular embrionaria.

**TABLA I: Congelación de embriones Bovinos (Willadsen, 1980)**

METODO LENTO	METODO RAPIDO
a. Adición de DMSO, a temp. ambiente en 3 fases: 5M: 10' 1.0M: 10' 1.5M: 10'	a. Idem
b. Enfriado rápido a - 6°C	b. Idem
c. Envasado (ampolla o pajuela)	c. Idem
d. Congelación a - 36 ° C (.3C/min.) y luego a - 60 ° C (.1 ° C/min)	d. Congelación a -30°C (.3° C/min) y luego a -33°C (1° C/min) y luego inmersión en N <sub>2</sub> líquido (-196°C).
e. Descongelación a temperatura ambiente.	e. Descongelado muy rápido (360°C/min).
f. Remoción de DMSO, en 6 etapas: 1.5 - 1.0 - 0.75 - .5 - .25M: 10' cada uno y pasar a PBS	f. Idem
g. Transferencia inmediata a vaca receptora.	g. Idem (pero permite más intervalo de transferencia).

**REFERENCIAS**

1. BILTON, R. (1980) Preservation of embryos of the large domestic species. 9th, Int. Cong. Anim. Reprod. (Madrid) II: 245-53.  
 2. WILLADSEN, S.; POLGE, C. and ROWSON, L. (1978) In vitro storage of cattle embryo in "Control of Re-  
 production in the Cow" Ed. J. Sreenan, Eur. Ec. Comm. Luxembourg.  
 3. WILLADSEN, S. (1980) Deep freezing of embryos in the large domestic species. 9th, Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. II: 255-61.  
 4. MASSIP, A. et al. (1980) Deep freezing of cattle embryos in french straws 9th, Int. Congr. Anim. Repro. A.I. (Madrid) III:462.

**COMO SE DESARROLLA RESISTENCIA**

gusanos sensibles  
gusanos resistentes

Nematodos resistentes están presentes en ovinos que nunca fueron dosificados, pero en muy pequeño número.

Una toma puede ser altamente efectiva contra estos estados.

Pero los nematodos resistentes, aunque existan en forma reducida, producen muchos huevos. Los ovinos comen pasturas contaminadas con larvas de esos huevos y portan una alta proporción de formas resistentes.

Ahora, la toma no es efectiva, y lo que es peor, mata los nematodos susceptibles incrementando la proporción de formas resistentes.

Eventualmente, todos los vermes son resistentes y el antihelmintico pierde su efecto.

(FUENTE: RURAL RESEARCH CSIRO 97-1977)

Demore la aparición de formas resistentes con un producto de probada eficacia contra los nematodos gastrointestinales y pulmonares:

**LEVA  
CERTUS**  
a base de LEVAMISOL

**J.B. Y R.A. VIDOVICH S.A.**  
Eduardo Acevedo 1629-31 - Tel. 4 42 75