

Transferencia directa de embriones bovinos congelados en un solo paso

Bonnevaux, J. ⁽¹⁾, Soñora, J. ⁽¹⁾, Irazoqui, C. ⁽¹⁾, De Cuadro, G. ⁽²⁾, Texeira, E. ⁽³⁾, Baptista, J. ⁽³⁾

RESUMEN

Se describe la metodología para simplificar el método de congelación-descongelación e implante de embriones bovinos. Para el congelado se utiliza una solución bufferada (Dulbecco) con Etilenglicol como crioprotector, mas el añadido de seroalbumina bovina al 4 % peso/volumen.

La descongelación se realiza 5 segundos al aire y luego en baño maría a 25°C durante 20 segundos. La implantación se realiza inmediatamente con suma delicadeza dada la fragilidad del material biológico.

Los autores reportan 8 preñeces obtenidas de 17 embriones implantados con este sistema, considerándolo como satisfactorio pero perfectible.

Palabras clave: transferencia embriones, metodología, un solo paso.

INTRODUCCION

Los primeros intentos de estandarizar un método, que simplificara y acortara los tiempos de procesamiento *in vitro*, de embriones bovinos, para ser sometidos a descongelación y posterior implantación, se remontan a los trabajos de S. Leibo en 1982. (4)

Renard et al. implementan una metodología similar en la misma época. (10)

En cuanto a los procesos de congelado, este último equipo utiliza 3 etapas con soluciones crecientes de glicerol como crioprotector, disuelto en solución salina bufferada (Dulbecco). Alojando el embrión en una pajuela de 0.25ml, con una solución de sucrosa separada por una burbuja de una mezcla gaseosa (90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂).

El método "one step" o "un solo paso", desarrollado por Leibo utiliza una sola inmersión en el crioprotector glicerol-al 1.6M, o sea al 15 %, y luego al alojarlo en la pajuela, se coloca una solución de sucrosa, separada del sector del embrión por una burbuja de aire.

El aspecto más importante y realmente simplificador de los sistemas propuestos, era el proceso de DESCONGELADO E IMPLANTACION.

El principio en el cual se basaba, era que al descongelarse, y mezclarse la solución de sucrosa, con la que contenía el embrión, el Glicerol-EMBRIOTOXICO- era "retirado de las células" en base a la

hiperosmolaridad relativa de la Sucrosa. Luego *in utero* el embrión se rehidrataba, completándose así el proceso de "restauración biológica"

En 1986(6) el propio Leibo comunica una modificación al sistema anterior añadiendo 0.4% peso/volumen de SEROALBUMINA BOVINA.

Si bien ambos trabajos mencionan resultados de sobrevivencia embrionaria post descongelado compatibles con la sistematización de su uso, la dificultad para mezclar las soluciones y la potencialidad tóxica de la sucrosa impidió la adopción masiva de esta innovación.

Otras experiencias utilizando 0.4% de seroalbumina bovina y sucrosa fueron empleadas por Mapletoft et al (8) con embriones de ratón, utilizando distintas temperaturas y tiempos de descongelado para estudiar la sobrevida de los mismos.

Bui Xuan Nguyen (2) et al comunican un método que simplifica el proceso de congelación y que también descongela e implanta en un solo paso utilizando Sucrosa.

El procedimiento es conocido como "vitrificación" (12). El embrión es acondicionado en una pajuela y es sumergido directamente en nitrógeno líquido a una temperatura de -196° C.

Quienes experimentaron con el método obtuvieron una sobrevida del 15% mas allá de los 90 días post implantación.

Según la literatura revisada (9) el problema radicaría en la toxicidad de solucio-

nes muy concentradas del crioprotector empleado, glicerol o dimetil sulfoxido al 3.5 M, inadmisibles para las células del embrión (9) como el etilenglicol y el 1-2 propanendiol(*). Su fundamento biológico estriba en no causar shock osmótico a las células del embrión. Por lo tanto una vez descongelados pueden ser transferidos directamente y rehidratarse *in útero*.

A partir de la década actual se comienza a probar con crioprotectores mas permeables a las células del embrión (9) como el etilenglicol y el 1-2 propanendiol(*). Su fundamento biológico estriba en no causar shock osmótico a las células del embrión. Por lo tanto una vez descongelados pueden ser transferidos directamente y rehidratarse *in útero*.

En 1992 Voeckel y Hu (11) informaron de 10 preñeces obtenidas de 26 embriones implantados directamente post descongelado. Los mismos habían sido congelados en un solo paso utilizando etilenglicol al 1.5 molar.

Dicho trabajo fue la base para otorgarles a los autores la patente sobre dicho método para los Estados Unidos (7) y es la actualmente vigente.

Nuestro objetivo fue el de conseguir un método que sintetizara, economía de tiempo y materiales para el trabajo práctico de congelación y descongelación-implante en condiciones de campo.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó una solución bufferada Dulbecco con seroalbumina bovina al 4% mas el agregado de ETILENGLICOL al 1.5 M como crioprotector. A la misma se le

⁽¹⁾Transgenes. San José. Uruguay - reprob@adinet.com.uy

⁽²⁾Instruments de Médecine Vétérinaire. Cassou. France. Cedex

⁽³⁾Ejercicio liberal. Uruguay

* Douchi, O. Uruguay, 1993. Comunicación personal

añadió antibióticos y antifúngicos. La solución fue preparada en el laboratorio central de IMV Cassou en Normandía (Francia).

Se utilizó un congelador de control computarizado-Freeze Control Model CL 863 de origen australiano. La misma permitió seguir automáticamente las curvas de congelado ya descriptas en trabajos anteriores (1).

La siembra de cristales (seeding) fue realizada manualmente.

El material biológico fue obtenido del remanente de dos transferencias de embriones "en fresco y en un tercer caso una donante fue colectada expresamente.

Donante 1-raza Limousin-total 3 embriones. (remanentes)

Donante 2-raza Fleckvieh-total 6 embriones(remanentes)

Donante 3-raza Limousin- total 9 embriones (colectados y congelados inmediatamente)

Los 18 embriones fueron clasificados como «buenos» morfológicamente y se encontraban desarrollados entre el estadio de morula compacta y el de blastocisto incipiente. O sea entre 6 días y medio y 7 de edad.

Para ser sometidos al proceso de congelación, todos fueron acondicionados en pajuelas francesas de 0.25 ml.

Luego del procedimiento fueron identificados por donante, almacenados en "goblets" de los utilizados corrientemente para almacenar semen, y colocados dentro de un termo banco a -196°C.

Las receptoras fueron revisadas ginecológicamente previo a su integración al programa y luego sincronizadas cíclicamente mediante el uso de implantes auriculares de Progesterona.

Para la implantación de los embriones Fleckvieh se trató de vacas adultas Holando secas que ya habían sido destetadas de transferencias anteriores.

Para los embriones Limousin se utilizaron mayoría de vaquillonas vírgenes de la raza Normando y cruza.

Los implantes fueron retirados luego de 10 días en los animales, ocurriendo el celo entre las 48 y las 72 hs. en el 80% de los casos.

La detección de celo fue hecha entre 4 y 5 veces por día, anotándose la identificación del animal y la hora de comienzo del mismo.

Todos los embriones fueron transferidos por la vía no quirúrgica.

Los 12 obtenidos de las Limousin fueron implantados en el mes de Noviembre, encontrándose las receptoras entre el día 6.5 y el 7 post celo. Estaban conservados "en banco" desde el mes de Mayo del mismo año.

Los de la raza Fleckvieh se implantaron sobre la mitad de Diciembre y habían

sido congelados en la primavera anterior.

Los establecimientos se ubican en Tacuarembó y Norte de Paysandú respectivamente. La temperatura media a la hora del comienzo-8 horas- se ubicó entre 28 y 30°C.

Las receptoras habían sido encerradas a corral la noche anterior solo con agua disponible.

Recibieron 1ml de Acepromacina intramuscular y entre 2 y 6ml de Lidocaina por vía epidural, 10 minutos antes de ser transferidas.

Las pajuelas con los embriones fueron retiradas del termo con ayuda de una pinza, agitadas al aire por 5 segundos y luego sumergidas por 20 segundos en baño maría a 25°C.

Cada receptora fue colocada en el cepo, higienizada su región perineal con agua y

plantas auriculares de Norgestomet mas valerato de estradiol inyectable.

Sin embargo estudios recientes (*) demuestran que esta metodología solo debe ser utilizada inyectando 1000 UI de HCG (hormona coriagonadotropica rica en hormona luteinizante) en el momento del celo de la receptora. Esta modificación fue introducida al comprobarse que si bien se produce un celo con ovulación, el Cuerpo Luteo siguiente en ocasiones es de pobre calidad secretando progesterona en muchos casos insuficiente para sobrellevar una gestación.

Consideramos que los resultados obtenidos según el siguiente cuadro, cumplen nuestras expectativas, estando dentro de los parámetros que mencionó Mapletoft (7) para todos los equipos que trabajan con este sistema en Canadá desde 1994.

VACA	IMPLANTADOS	PREÑEZ	+120 días
Li	1	3	1
Li	2	9	4
Fle		5	3
total		17	8

jabón y previo a la colocación del instrumento con el embrión, se utilizó una torunda de algodón impregnada con alcohol para limpiar la comisura vulvar.

Previo al descongelado se verificó la presencia y situación del cuerpo luteo, una vez obtenido este dato se procedía a retirar el embrión del termo.

El tiempo máximo entre descongelado e implantación fue de dos minutos. Todos ellos fueron colocados utilizando el equipo de vaina miniaturizado de IMV Cassou (5).

El montaje de la paillette, su recubrimiento, transporte e implantación fue hecho con el máximo cuidado higiénico y delicadeza "mecánica", teniendo en cuenta la "fragilización" del citoesqueleto celular luego de los procesos de congelado y descongelado (3).

La implantación fue realizada en el cuerpo ipsilateral al Cuerpo Luteo con la máxima profundidad posible. Uno de los embriones Fleckvieh fue descartado al estallar parte de la pajuela.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo a nuestra experiencia anterior y a comunicaciones al respecto (11); decidimos esperar un desarrollo fetal avanzado para confirmar la gestación por palpación rectal y/o ecografía.

En todos los casos la exploración rectal fue hecha mas allá del día 120 posterior a la implantación.

Por razones de manejo y tiempo todas las receptoras fueron sincronizadas con im-

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonnevaux, J.; Bottaro, R.; Cuenca, L.; Alegre, A. (1990) Sistema mecánico de operación manual para congelación de embriones bovinos. *Veterinaria (Montevideo) oct.-dic.*:15.
- Bui-Xuan-Nguyen; Heyman, Y.; Renard, J.P. (1984) En: *Curso Criopreservación de embriones de mamíferos. Universidad Austral de Chile, Valdivia, 1986.*
- Dobrinzky, J.; Johnson, L.; Dverstrom, E.; Duby, R.; Duffy, P.; Roche, J.; Boland, M. (1996) *Cytoskeletal stabilization during cryopreservation of mammalian embryos. En: Congress on Animal Reproduction, 15th., Sidney, Australia.*
- Donaldson, E. (1982) *Embryo transfer in cattle. Rio Vista International.*
- IMV. *Bovine General Catalog (1992).*
- Leibo, S.P. (1986) Commercial production of pregnancies from «one step» diluted-thawed bovine embryos. *Theriogenology 25(1):166.*
- Mapletoft, R. (1996) *La transferencia directa de embriones bovinos congelados. En: Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2o., Córdoba, Argentina.*
-; Moker, J.; Palasz, A. (1989) Effect of thawing temperature and time to sucrose dilution on survival of mouse embryos in culture. *Theriogenology 3(1).*
- Palasz, A. (1993) *Recientes avances en la criopreservación de embriones de mamíferos. En: Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina.*
- Renard, J.P.; Heyman, Y.; Ozil, J.P. (1982) *Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongelation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés une seule fois en paillettes. Ann. Méd. Vet. 126:23-32.*
- Voeckel, S.A.; Hu, Y.X. (1992) Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology 37:23-37.*
- Zwelden, P. Van Der; Tovati, K.; Ectors, F.; Massip, A.; Beckers, J. and Ectors, J. (1989) *Vitrification of bovine blastocysts. Theriogenology 31:(1)*

(*)Pastor, J. *Intervet International. Jornada INIA*

«La Estanzuela», Uruguay 1997, Comunicación personal