

Sistema mecánico de operación manual para congelación de embriones bovinos

Dres. Bonnevaux, J. * ; Bottaro, R. * ; Cuenca, L. * ; Alegre, A. **

INTRODUCCION

La congelación de embriones bovinos, su conservación a -196°C en nitrógeno líquido, su posterior descongelación e implante, es una tecnología de utilización corriente en países desarrollados (5-9-14-16-19)

Su difusión a los países en desarrollo se ha incrementado lentamente en los últimos años (3-4-5-12)

Dicha técnica permite superovular hembras bovinas en cualquier época del año, bajo condiciones especiales de nutrición y manejo que sólo involucran a uno o pocos animales (donantes).

Ofrece una interesante alternativa en la transferencia de embriones frescos, donde la falta de receptoras sincrónicas en número equivalente a los embriones obtenidos hace a veces descartar material genético de gran valor o limitan los trabajos a épocas de abundancia forrajera.

En el Uruguay la primera comunicación de una gestación obtenida de un embrión congelado data de 1987 por Caorsi y colaboradores. (2)

El comercio internacional de embriones congelados se ha ido incrementando y expandiendo al permitir el traslado de material genético de gran valor a largas distancias con muy poco riesgo comercial y sanitario. (1-15-17)

El punto crítico en la técnica de congelación de embriones bovinos es lograr una curva de descenso térmico lenta, entre 0.3 y 0.5°C , cada minuto a partir de -7°C y hasta -35°C . (18)

Para ello se utilizan aparatos computarizados de elevado costo.

Nuestra alternativa, es la construcción de un aparato mecánico, de control manual de temperatura, adaptado a un bióstato común de los utilizados en conservación de semen.

Hemos diseñado a tales efectos una congeladora mecánica de acero inoxidable y plástico; de manipulación sencilla y con la cual hemos logrado a una justa de curva de descenso térmico.

MATERIAL Y METODOS

A. Descripción de la congeladora manual. Ver esquema A y B.

1. Vástago o soporte central hueco.
2. Recipiente rellenable con Metanol, donde se realiza al proceso de congelado de las pajuelas con el embrión.
3. Cremallera con perilla de control de descenso.
4. Soporte metálico.
5. Suncho o abrazadera para mantener inmóvil el sistema al cuello del bióstato.
6. Termómetro digital y sensor de temperatura (termocupla).
7. Burbujeador de pecera conectado con manguera de polivinilo al vástago central.

B. Material biológico utilizado.

Fueron congelados 40 embriones bovinos. Todos ellos obtenidos de lavados uterinos el día 7 post inseminación artificial, observándose estadíos entre mórulas compactas y blastocistos.

C. Proceso de congelación.

Previo a ser incluidos en las soluciones de criopreservación, los embriones fueron "lavados" cinco veces en solución Dulbecco con 2% de suero fetal bovino. (6). Una vez realizados es-

tos pasos, los embriones se colocaron diez minutos en cada una de tres etapas, en soluciones Dulbecco con concentraciones crecientes de glicerol, de modo de evitar el shock osmótico (7)

1er. paso-Embriones+solución Dulbecco con glicerol 0.5 Molar durante 10: Foto 1.

2do. paso-Embriones+solución Dulbecco con glicerol 1.0 Molar durante 10: Foto 2.

3er. paso-Embriones+solución Dulbecco con glicerol 1.5 Molar durante 10: Foto 3.

Concluido el tercer paso, los embriones fueron acondicionados de a uno en pajuelas francesas de 0.25 ml que a su vez fueron selladas por calor en su extremo distal (16). Luego, se colocaron en el recipiente (2 en el esquema) que había sido completado previamente con metanol.

ESQUEMA A. Diferentes componentes del sistema de congelación. Ver referencias en el texto.

ESQUEMA B. Sistema de congelación montada sobre criostato.

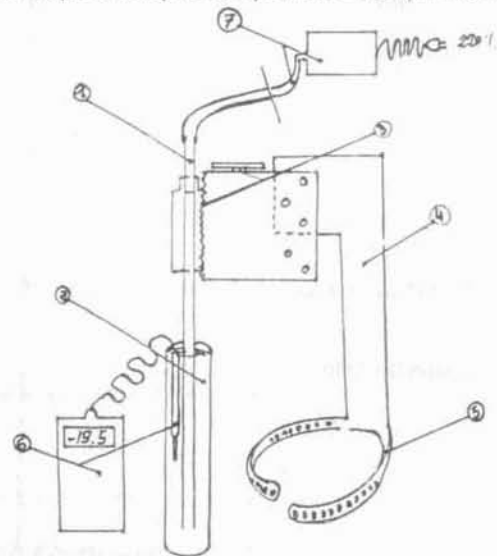
Se conectó el burbujeador al vástago, mediante un tubo de PVC y también al toma corriente. Al activarse dicho aparato se genera un burbujeo permanente del metanol, que contribuye a homogeneizar la temperatura de todo el recipiente y su contenido.

El descenso térmico se realiza mediante la perilla (Nº 3 en el esquema) que al girarla en uno u otro sentido hace subir o bajar al recipiente.

El descenso se realizó en dos etapas. La primera a una cadencia de 1°C por minuto, desde temperatura ambiente hasta llegar a -7°C . Allí se estabiliza el sistema durante diez minutos, al final del cual se realiza el procedimiento conocido como "seeding" o siembra de cristales.

El mismo se lleva a cabo enfriando una pinza de cirugía de acero inoxidable en nitrógeno líquido; tocándose de inmediato las pajuelas conteniendo el embrión.

La segunda etapa, que comienza en -7°C , debe alcanzar -35°C a un ritmo de $0.3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, lo que implica un alto grado de atención de parte del operador, quien debe manipular lentamente



ESQUEMA A. Diferentes componentes del sistema de congelación. Ver referencias en el texto.

* DMV- Ejercicio libre de la profesión

** Ayudante técnico. DILAVE "Miguel C. Rubino" CC 6577

el mecanismo de control, conforme la lectura registrada en el termómetro digital.

Una vez obtenidos los -35°C, se retiran rápidamente las pajuelas del recipiente y se sumergen directamente en nitrógeno líquido, utilizando a los efectos una conservadora común de espuma plast.

Para identificar/almacenar los embriones, se utilizaron cilindros plásticos de los comunes para semen, escritos con lápiz indeleble en su exterior. Luego fueron colocados en una canastilla de un bióstato común.

DESCONGELADO E IMPLANTACION

Previo a su implantación las pajuelas fueron retiradas de su

almacenamiento y sumergidas en Baño María a 37°C durante 10 min.

Se secaron prolijamente con toallas descartables; se cortaron sus extremos para permitir la evacuación de la solución con los embriones, que fueron sometidos nuevamente a tres lavados de diez minutos en las mismas condiciones de glicerol, pero en concentraciones decrecientes. (8)

Antes de transferirlos fueron lavados en Dulbecco + 2% de suero fetal bovino, evaluados y clasificados ópticamente. (Linder y Wright) (10-11)

Un número de trece fue considerado como excelente y un número de dieciséis con uno o más defectos. Los once restantes (de los cuarenta originales) no fueron sometidos a desconge-

CODIGOS (Ficha Directorio Veterinario)

Actualización de datos, a efectos de realizar un Directorio para su public. que será distribuido en el V Congreso Nacional de Veterinaria, Nov. 1992.

GRUPO DE ANIMALES CODIGO DE GRUPO	AREA PROFESIONAL CODIGO AREA		FUNCION EN EMPLEO CODIGO FUNCION	EMPLEADOR CODIGO EMPLEADOR
01 An. de granja	20 Administración	32 Nutrición	50 Administración	70 Clínica Privada
02 An. laboratorio	21 Anatomía	33 Parasitología	51 Diagnóstico	71 Comercio
03 An. silvestres	22 Avicultura	34 Patología	52 Docencia	72 Independiente
04 Aves	23 Bioquímica	35 Pesca	53 Ejerc. Liberal	73 Industria
05 Bovinos	24 Cirugía	36 Producción	54 Extensión	74 Internacional
06 Caninos	25 Clínica	37 Productor	55 Inspección	75 Laboratorio
07 Caprinos	26 Diagnóstico	38 Reprod. (aclarar)	56 Investigación	76 Ministerio
08 Equinos	27 Epidemiología	39 Salud Pública	57 Jubilado	77 Productor
09 Felinos	28 Farmacología	40 Tecnol. (aclarar)	58 No ejerce	78 Soc. Productores
10 Ovinos	29 Fisiología	41 Toxicología	59 Producción	79 Universidad
11 Peces	30 Inmunología	42 Vet. Industrial	60 Ventas o Servicios	80 Otros (aclarar)
12 Suinos	31 Microbiología	43 Otros (aclarar)	61 Otros (aclarar)	

FICHA DIRECTORIO VETERINARIO

Actualización de datos, a efectos de realizar un Directorio para su publicación, que será distribuido en el V Congreso Nacional de Veterinaria, Noviembre 1992.

Nombres Apellidos

Dirección: Calle Nº Apto Ciudad Código Postal

Depto..... País..... Tel:..... /..... FAX:.....
Particular Trabajo

Sociedad de Medicina Veterinaria: Socio SI..... NO..... Información Profesional: (VER CODIGOS)

Grupo de animales:..... Área Profesional:.....
(escriba código(s) y subraye el principal) (escriba código(s) y subraye el principal)

Función en empleo:..... Empleador:.....
(escriba código(s) y subraye el principal) (escriba código(s) y subraye el principal)

— corte y envíe estos datos a SMVU o el Centro Veterinario —

lado permaneciendo en el bióstat.

Todos los descongelados fueron implantados en veintinueve vaquillonas cruce Holando X Angus que se encontraban entre el día 6 y el 7 del ciclo estral. De acuerdo a ello fueron implantados mórulas o blastocistos respectivamente.

A excepción de dos, todas las restantes transferencias fueron realizadas por la vía no quirúrgica. (9) (13)

El lapso entre el proceso de congelado-almacenamiento y descongelado-implantación fue mayor de dos meses en todos los casos.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Transcurridos 50 días del implante se realizó diagnóstico de gestación por vía rectal. El cuadro adjunto muestra los resultados.

Embriones de excelente calidad	gestaciones	
Implantados	Nº: 13	8
Embriones con uno o + defectos	gestaciones	
Implantados	Nº 16	3
Total implantados Nº: 29	Total gestaciones:	11

Si bien desde el punto de vista estadístico los resultados no son significativos, la experiencia descrita abre excelentes perspectivas para seguir trabajando con el aparato y la metodología expuesta.

El mismo posee dos ventajas importantes, una su bajo costo, lo que lo hace accesible a cualquier unidad de transferencia que opere en el país y segundo que puede ser transportado en poco espacio con mínimo riesgo lo que no sucede con los equipos de congelación que operan con la base de una computadora.

AGRADECIMIENTOS

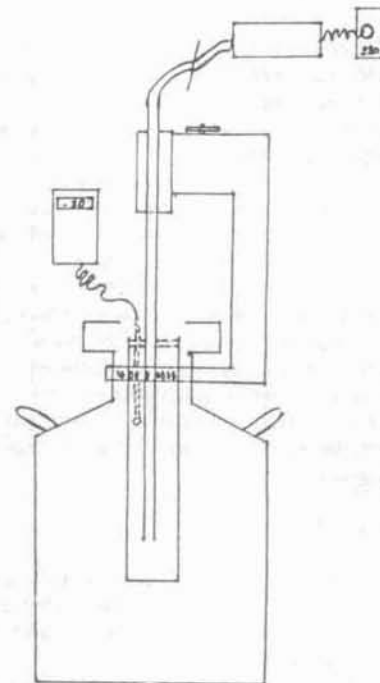
A los doctores Marcelo del Campo y Renato Gatica del Departamento de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. Con ellos aprendimos los fundamentos de la técnica y discutimos la fabricación del aparato manual.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Beridian K.; Mills M.; Bligh P.; Geroldi R.; Kilner B. "Commercial export of bovine embryos from Canada to Europe" Theriogenology Vol. II, 3, 1979.
- Caorsi C.; García Pintos; Algorta M. "Transferencia de un embrión bovino conservado en nitrógeno líquido y descongelado" XV Jornadas Uruguayas de Buiatría - Paysandú 1987- Uruguay
- M. R. del Campo "Transferencia de embriones en Centro y Sudamerica, dónde estamos y hacia dónde iremos?" XVI Jornadas de Buiatría - Paysandú 1988 - Uruguay
- M. R. del Campo "Nuevas técnicas en Reproducción Animal aspectos básicos y aplicados" Jornadas de Buiatría - Paysandú 1988 - Uruguay
- M. R. del Campo "Consideraciones sobre los científicos de las biotécnicas en la reproducción animal" 10ª Jornadas de Reproducción Animal. Venado Tuerto - Argentina 1986
- M. R. del Campo "Preservación de embriones a bajas temperaturas". Curso de post-grado Criopreservación de embriones de mamíferos. Universidad Austral de Chile - Valdivia 1987 - M. R. del Campo - Editor p.
- M. R. del Campo "Enfriamiento y congelación de embriones" Curso postgrado, Criopreservación de embriones de mamíferos. Universidad Austral de Chile - Valdivia 1987 - M. del Campo - Editor p. 76.
- M. R. del Campo

"Descongelación y criterios de evaluación de embriones". Curso de post-grado, Criopreservación de embriones de mamíferos. Universidad Austral de Chile - 1987 - M. del Campo - editor p. 88.

- Heyman Y.; Clusna P. "Freezing bovine embryos; survival after cervical transfer of one half one or two blastocysts frozen in straws". Theriogenology Vol. 21 p. 240, 1984
- H. Lehn Jensen and W. F. Reell "Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing" Theriogenology Vol. 19 (2) p. 263
- Linder G. M. Wright R. W. "Bovine porphogy and evaluation" Theriogenology 1988 Vo. 20 p. 407
- Linares T. "Aplicación de la tecnología del transplante de embriones" XIV Jornadas de Buiatría - Paysandú - Uruguay, 1986
- Nibart M.; Florin B.; Mehekour F.; Humblot P.; Thi bier M. "Range of the pregnancy rates of surgically transferred bovine embryos" Theriogenology Vol. 25 p. 176, 1986
- A. Massip; P. Van der Zwalmen; F. Ectors "Recent progress in criopreservation of cattle embryos" Theriogenology Vol. 27 p. 1, 1987
- C. Munar y asociados "Results of the first frozen embryos exported from the USA to Argentina" Theriogenology Vol. 31 Nº 1, 1989
- Renard J. P.; H. Jeyman Y.; Ozil J.P. "Congélation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés une seule fois en paillettes. Ann. Méd. Vét. 126, 23-32, 1982
- Santos Valdéz; Tervit H. R.; Elsdon P.; Seidel H. "Transport of frozen cattle embryos from USA to Mexico" Theriogenology Vol. 27 p. 32, 1987
- T. Toyoda "Principios de criopreservación de oocitos y embriones de mamíferos". Curso de post grado. Criopreservación de embriones de mamíferos. Universidad Austral de Chile - Valdivia, 1987 M. R. del Campo Editor
- Wright J. M. "Commercial freezing of bovine embryos in straws" Theriogenology Vol. 23:17, 1985



ESQUEMA B. Sistema de congelación montado sobre criostato