XVI JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA
Paysandú, R.O.U., 15 - 17 de junio de 1988

FACULTAD DE VETER... Depto. Doc. y Bibl...

NUEVAS TECNOLOGIAS EN REPRODUCCION ANIMAL: ASPECTOS BASICOS Y APLICADOS

[1] Dr. Marcelo R. Del Campo

RESUMEN

El objetivo de esta presentación es comentar las biotecnologías de la reproducción animal, especialmente aquellas aplicadas en la especie bovina. Entre estas se mencionarán la sincronización de los ciclos estrales, la superovulación, la transferencia de embriones, la criopreservación, la producción de múltiples a través de cultivo de blastómeros o microcirugía. Otras técnicas de aplicación futura serán comentadas brevemente, por ejemplo la determinación de sexo, la fertilización in vitro, la producción de animales transgenéticos, etc.

Seguramente todas éstas biotécnicas contribuirán en alguna forma a aliviar los problemas de alimentación y a mejorar la calidad de vida de los pueblos, especialmente en los países en desarrollo o subdesarrollados.

El progreso que se ha hecho en la última década ha sido espectacular y el que se realizará en el futuro no tiene límit s imaginables.

INTRODUCCION

Las técnicas asociadas con la transferencia de embriones han sido utilizadas tanto en investigación como en la práctica. A pesar que esta biotécnica ha sido aplicada en la reproducción animal a partir del año 1972, el progreso genético que se ha obtenido ha revolucionado la industria animal. Esto se observa en los países en desarrollo, mejor.

La técnica de la transferencia de embriones en el bovino fue inicialmente desarrollada en las Universidades e Institutos de Investigación. Aunque la metodología se desarrolló primeramente en animales de laboratorio, como la laucha, la coneja y en otras especies domésticas como la oveja, la transferencia de embriones ha adquirido mayor desarrollo y aplicación práctica en la especie bovina.

---

[1] Ejercicio Liberal Casilla de Correo 100 Valdivia CHILE

En la última década un gran número de avances biotecnológicos han ocurrido, entre los que se pueden mencionar la sincronización de los ciclos estrales de las hembras con el aparecimiento de productos como la prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$), la superovulación con el uso de hormonas gonadotróficas, especialmente con los preparados comerciales de la hormona folículo estimulante porcina (FSH-P) y la gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMS-G) con las cuales se obtiene gran cantidad de gametos femeninos (oocitos) que al ser fertilizados y en combinación con la transferencia de embriones aumentan la productividad de la hembra y aceleran el progreso genético al obtener un gran número de cría de hembras elite.

La criopreservación de embriones a la temperatura del nitrógeno líquido (-196° C) ha permitido suspender el proceso de la vida y mantener indefinidamente bancos de gametos. La microcirugía y el cultivo de blastómeras ha permitido la producción de mellizos o múltiples idénticos.

Otras técnicas de aplicación futura que actualmente se están desarrollando en los laboratorios son aquellas que se relacionan con la determinación del sexo, las cuales identifican machos de hembras, ya sea a través de la separación de los espermios o a través de la identificación de los embriones. La maduración in vitro de los oocitos obtenidos desde los ovarios, de los cientos que poseen las hembras. La fertilización in vitro (IVF). La producción de copias de individuos genéticamente idénticos a través del clonaje, ya sea con transplantes nucleares o la introducción de DNA dentro del núcleo en la producción de animales transgenéticos.

Algunos países en desarrollo recién comienzan a aplicar alguna de estas biotecnologías, especialmente la transferencia de embriones, otros en cambio siguen luchando para aplicar aún tecnologías tan simples como es la inseminación artificial, que aún no ha tenido el desarrollo que debiera haber tenido.

Es difícil imaginar el rol que jugarán las biotecnologías en la producción animal pero con seguridad causarán un gran cambio en el futuro.

Los países desarrollados han comprendido la importancia que tienen estas biotécnicas en el desarrollo de sus pueblos y es por esto que existe una gran cantidad de científicos que en diferentes partes del mundo trabajan investigando sobre ellas.

Seguramente todas estas biotécnicas contribuirán en alguna forma a aliviar los problemas de alimentación y a mejorar la calidad de vida de los pueblos, especialmente en los países subdesarrollados o en desarrollo.

El objetivo principal de esta presentación es entregar una idea general de las biotecnologías que se están desarrollando o aplicando actualmente en la reproducción animal, especialmente en la especie bovina. No es la intención de este informe dar detalles de cada una de las técnicas que se indican.

SUPEROVULACION

Con los tratamientos de superovulación se trata de obtener un alto número de embriones viables.

Uno de los mayores problemas relacionados con la ET ha sido el no haber encontrado hasta ahora un método eficiente que controle el número de ovulaciones cuando una hembra es inyectada con gonadotrofinas. Las hormonas y esquemas de tratamiento utilizados producen respuestas excesivamente variables haciendo imposible controlar el número de ovulaciones y consecuentemente el número de oocitos liberados.

Las gonadotrofinas más usadas son: la Hormona Folículo Estimulante Porcina (FSH-P) la Gonadotrofina Sérica de Yegua Preñada (PMS-G) y la Gonadotrofina Menopáusica Humana (HMG).

Generalmente los tratamientos de superovulación se comienzan durante los días 9-10 del ciclo estral. Considerándose el día del celo como día 0 (día cero). Normalmente las donantes son tratadas con una dosis total de 28 - 30 mg de FSH-P. Esta dosis se distribuye en 8 inyecciones administradas 2 veces al día (Ver Cuadro N°1). Una dosis de $PGF_2\alpha$ es administrada junto con la 5a. inyección de FSH, es decir 60 horas más tarde de la primera inyección de FSH.

Las hembras presentan celo 36 a 48 horas después de la PGF. La donante que presenta celo es inseminada rutinariamente 12 a 24 horas después del comienzo del celo con una dosis de semen cada vez. Si la hembra donante no está ciclando normalmente o no se sable con seguridad cuando presentó celo se puede utilizar Synchro-Mate-B (Ceva Labs.Inc., Overland Park, K.S., U.S.A.), un implante que se inserta en la oreja y se mantiene por 9 días . El tratamiento con FSH se comienza 7 días después de haber colocado el implante (el primer día de colocación del implante se considera como día 0, Cuadro N°2). El esquema de IA es similar al descrito anteriormente.

El implante de Synchro-Mate-B contiene 6 mg de progesterona sintética, norgestomet (17 a acetoxy - II B metil 19 nor-pregn-4-ene-3,20 dione). La colocación del implante en la oreja es acompañada de una inyección IM (1 ml) de 3 mg norgestomet y 5 mg de valerato de estradiol.

La FSH-P (P = porcina) la producen diferentes laboratorios (ej.: FSH-P Burns-Biotec; FSH-P, Shering Corp. Kenilworth, NY, U.S.A.). Recientemente ha aparecido en el mercado el Foltropin (Vetrepharm Inc., London, Ontario, Canadá) una FSH-P altamente purificada. Además, el laboratorio Elea (Saladillo, BS Argentina), está colocando en el mercado la Folitropina, otro producto preparado en base a un homogenado parcialmente purificado de pituitarias porcinas.

Muchos de estos productos contienen, además de la FSH, gran cantidad de LH lo que hace variar su eficacia (1, 2, 3).

Se ha indicado que la vida media de la FSH en la vaca es de aproximadamente 5 horas, por esta razón se hace necesario inyectarla 2 veces al día para que produzca una respuesta ovulatoria.

La PMS-G tiene la ventaja que es inyectada en una dosis única lo que hace más fácil el trabajo en condiciones de terreno, cuando se realizan tratamientos con personal no especializado. Esta hormona es un complejo glicoproteico con actividad FSH Y LH y tiene una vida media de aproximadamente 40 horas (5). Se ha indicado que se mantiene en la circulación sanguínea por más de 10 días (6).

Los tratamientos de superovulación en base a esta hormona se comienzan el día 9 o 10 del ciclo, utilizando una dosis única de 1.500 a 2.500 UI por animal.Cuarenta y ocho horas más tarde se inyecta la PGF para inducir la luteolisis del CL del ciclo.

Para prevenir la larga acción de la PMS-G se han utilizado anticuerpos en contra de la hormona (anti PMS-G) en esta forma se cree que se disminuiría la sobreestimulación ovárica (7). El tiempo más indicado para inyectar la anti PMS-G es 12 horas después del comienzo del celo (8).

Los esquemas de tratamiento de superovulación con la hormona menopáusica humana son similares al utilizado con la FSH-P (inyección cada 12 horas por 4 días).El problema de su uso es el alto costo.

Algunos factores que deben considerarse al realizar un tratamiento de superovulación:

1. Hembras donantes que ciclen normalmente, que estén en un buen estado reproductivo (ej.: 50 días post parto, sin alteraciones o metritis), sanitario y de nutrición (ej.: no demasiado gordas o demasiado flacas).

2. Hembras sin historial de fertilidad.

3. Es recomendable comenzar los tratamientos el día 9 o 10 del ciclo, a pesar que las hembras responden entre los días 6 - 14 (9).

4. Hormonas altamente puerificadas con una alta actividad FSH tendrán un efecto positivo en las tasas de fertilización y número de embriones transferibles. Se ha indicado que los efectos nocivos a altas dosis de gonadotrofinas estarían relacionados con un alto contenido de LH de estos preparados comerciales (10).

5. Administración de la FSH-P en dosis decrecientes por un lapso de tiempo de 4 a 5 días, utilizando una dosis total entre 28 y 30 mg de FSH mejora la respuesta superovulatoria (11).

6. Se ha indicado que hembras adultas o lactantes responden mejor con dosis de FSH más altas que las hembras jóvenes (12). Al respecto, también debe considerarse la raza de la donante. Hembras Bos-indicus requieren menores dosis que hembras Bos-taurus (12).

7. Si la respuesta ovulatoria no es buena, puede aumentarse la dosis gonadotrofica en el tratamiento siguiente. Si la calidad de los embriones es deficiente en vacas sobreestimuladas (gran N° de CL) será necesario disminuir la dosis de gonadotrofina.

8. Asegurarse que el CL presente durante el tratamiento superovulatorio sufra una completa regresión. Así se impedirá anormalidades de los oocitos o un desbalance endócrino.

9. Existen hembras que responden mejor con tratamientos que se comienzan más temprano en el ciclo. Esto puede estar relacionado con una asincronía de la onda folicular (14).

10. Tomar en consideración la colección simple de un embrión en hembras no sometidas a tratamiento.

La variabilidad a la respuesta ovulatoria utilizando gonadotrofinas ha sido atribuída a diferentes causas. Entre las cuales se han indicado: a) Preparación y lote de la hormona; b) Duración y tiempo de comienzo del tratamiento; c) Dosis total utilizada (1, 11). Otras causas estarían relacionadas con la hembra misma como son: a) estado nutricional y reproductivo; b) edad, raza; c) estación del año.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La TE se ha aplicado prácticamente a casi la totalidad de las especies domésticas y también a especies salvajes (zoológicc) y exóticas. La especie humana no ha escapado a esta tecnología.

Un prerequisito para la aplicación práctica de la TE es el uso de métodos no quirúrgicos de colección y transferencia de embriones.

La TE envuelve muchos pasos que individualmente influyen en los resultados finales es decir, en el número de crías nacidas.

La TE produce un mejoramiento genético aumentando la tasa reproductiva, especialmente cuando se combina con la superovulación. Por ejemplo, si todos los reemplazos se pudieran obtener del 10% de mejores hembras del rebaño, el progreso genético, sería aproximadamente 3 veces más rápido que utilizando la selección normal. Sin embargo, la mayoría de los genetistas están de acuerdo que la TE produce un progreso genético más lento que si se usara la IA. Esta aseveración es correcta si se considera que la IA es aplicada a una gran población (programa nacional por ejemplo) de hembras, pero si se toma en consideración un sólo rebaño con hembras elite a las cuales se les somete a tratamiento de superovulación y TE se producirá un aumento de la intensidad de selección y se acortará el intervalo generacional.

Si la TE se aplica a hembras elite, la genética de éstas se diseminará a grandes rebaños a través del uso de la IA. De hecho la TE se utiliza para la producción de toros para inseminación.

Una de las desventajas de la TE es su alto costo, por lo tanto, si se optimizan los resultados, los costos se reducirán para el ganadero. Los costos (directos) mayores para el ganadero son la cancelación del servicio y lo relacionado con las receptoras y sus crías. Los costos indirectos incluyen el interés sobre la inversión y las pérdidas. Para que una cría obtenida por transferencia sea conveniente producirla, debe tener un valor aproximado de 2 0 3 veces mayor que el valor de una cría obtenida en forma convencional (IA).

En un comienzo los embriones fueron colectados quirúrgicamente desde el tracto reproductivo de la vaca (17) . Posteriormente, en el año 1976 se reportaron las técnicas no quirúrgicas de colección (18, 19). Básicamente todas las técnicas no quirúrgicas son similares y consisten en el paso de un catéter Foley a través del cer

vix y su ubicación en uno de los cuernos uterinos.

En la especie que más se ha aplicado TE es en la especie bovina, no sólo por su incentivo económico,sino también por la facilidad de realizar tanto la recuperación de embriones como la transferencia en forma no quirúrgica.

El veterinario debe estar consciente que la técnica en la vaca no es un procedimiento aséptico, pero debe extremar los cuidados para que el embrión se mantenga libre de microorganismos. Al respecto existe un manual sobre los procedimientos sanitarios y manejo de los embriones que indica la forma a seguir (20).

Generalmente, el medio de cultivo es preparado antes de la colección. Existen diferentes medios de cultivo, pero el más usado es el Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS; Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.). Es recomendable utilizar agua bidestilada de buena calidad. El medio es filtrado a través de un filtro Millipore de 0.22 a 0.45 um y guardado refrigerado (4°C) en botellas de 1.000 ml.

Al momento de su uso se le agrega suero fetal inactivado (FCS) y una solución de antibióticos/antimicóticos. Estas pueden mantenerse congeladas y preparadas para 1.000 ml. de tal forma que al momento de colectar una vaca, basta agregarlas al medio. El suero fetal puede sustituirse por suero de novillo o ternero recién nacido, incluso suero de vacas que han sido superovuladas (Cuadro N° 3).

El medio de cultivo se mantiene a temperatura ambiente (20°C) o sea entibia a 37° C para su uso. Es recomendable mantener el medio a una temperatura constante durante la colección.

La esterilización de todo el equipo se realiza en diferente forma: material de vidrio, al calor seco; material de plástico o teflón, al autoclave; y material de goma, plástico y teflón, con óxido de etileno. La esterilización con este último o con sustancias químicas puede matar a los embriones por lo que es recomendable airear el material por un período prolongado de tiempo.

Una vez que el tracto reproductivo de la donante ha sido lavado, se realiza la búsqueda y evaluación de embriones (22). Posteriormente los embriones evaluados como transferibles son colocados en un medio de cultivo de mantención a 37°C o a temperatura ambiente (Cuadro N°) y son transferidos a receptoras previamente sincronizadas con la donante o son congeladas para su posterior descongelación y transferencia.

Es posible también mantener los embriones a 4° C en un refrigerador por 2 o 3 días. Esta es una alternativa en el caso de no contar con receptoras en número suficiente en ese momento. Esto da la oportunidad de ubicar receptoras en otros predios (23 y 24).

TECNICA NO QUIRURGICA DE COLECCION DE EMBRIONES EN BOVINOS

Existe, básicamente, una técnica no quirúrgica de colección de embriones con dos diferentes modalidades:

1. Recuperación por gravedad con circuito cerrado de circulación (18).
2. Recuperación por aspiración interrumpida (25).

Dentro de estas modalidades se describen infinidad de variables, combinaciones, adaptaciones, etc. Cada técnico o grupo de trabajo tiene su propia técnica. Lo importante en la colección es el éxito que se obtenga al aplicarla y, esto se traduce en la obtención de un alto porcentaje de embriones.

Para un técnico que recién comienza, el método por gravedad es más fácil realizar lo que el método por aspiración. Además, en el primero se mantiene mejor la asepsia (sistema cerrado) y hay menos posibilidad de perder el medio de cultivo que se colecta desde el útero.

A continuación se describirá básicamente las modalidades publicadas por Rowe y colaboradores, con algunos cambios realizados por el autor, comentando además ciertas adaptaciones efectuadas por otros autores o grupos de trabajo.

Preparación de la donante

La donante es colocada en un brete y las heces son evacuadas del recto (no siempre es necesario hacerlo). El número de CL es estimado en este momento o bien después que haya recibido anestesia epidural (xilocaína al 2%). Es importante no comenzar el trabajo de colección de embriones sin tener la seguridad que la anestesia haya tenido efecto. Se lava la región perineal y labios vulvares con agua y jabón desinfectante, se seca el área y se aplica alcohol u otro desinfectante suave. La cola se amarra a un costado de la donante.

Existen básicamente tres clases de catéteres para la colección no quirúrgica: Foley de 2 vías, Foley de 3 vías y el modelo Neustadt:Aisch (26).

Los catéteres más usados son el Foley de 2 vías y el Foley de 3 vías. Estos catéteres son fáciles de encontrar en el comercio y son relativamente baratos. Tienen algunos inconvenientes para usarlos en colección de embriones, por ejemplo: son relativamente blandos y cortos (sobre todo cuando se usan en vacas grandes). Miden 40 cms. de largo, el extremo entre el globo y la punta mide 3 cm. y presenta 2 orificios.

El modelo Neustadt/Aisch de 2 vías tiene varias ventajas sobre los Foley (26). Es más largo (67 cm) y relativamente duro, lo que permite introducirlo más profundamente en el cuerno sin ayuda de estilete. El extremo entre el globo y la punta mide 5.5 cm. y tiene 4 orificios. Además, trae incluído en el otro extremo una adaptación Luer/Lock.

Algunos autores recomiendan el uso de un dilatador del cervix previo a la introducción del catéter para dilatar el canal cervical y facilitar la introducción del catéter (27). También recomiendan la aspiración del mucus cervical usando una pipeta de infusión. Ambas recomendaciones no han sido necesarias en nuestra experiencia.

Preparación previa del equipo

Los catéteres, una vez usados, son lavados con agua y jabón y esterilizados con oxido de etileno, también es necesario estar seguro que los catéteres estén secos antes de la esterilización con óxido de etileno y permitir una ventilación suficiente (ver recomendaciones del fabricante) después de la esterilización. Se ha indicado que el óxido de etileno sería letal para los embriones.

Al catéter (Foley de 2 vías o el modelo Neustadt/Aisch) se le introduce un estilete metálico y se le coloca un lubricante estéril soluble en agua (K-Y-yell,Johnson New Brunswick, New Jersey, U.S.A.) y se introduce a través de la vagina y cérvix. Si existe algún tipo de infección en la vagina se recomienda que el catéter vaya dentro de una vaina plástica para prevenir la contaminación del útero

Una vez pasado el cérvix, el catéter es llevado directamente a uno de los cuernos (generalmente el cuerno ipsilateral al ovario que presenta mayor número de CL). Para el técnico que recién comienza es recomendable realizar 1° el cuerno que le es más difícil (generalmente el izquierdo). Una vez ubicado el catéter en el cuerno, el estilete es retirado 2 a 3 cms y es empujado suavemente. Esta maniobra se repite hasta que la punta del catéter esté en la posición deseada (mitad del cuerno o un poco más craneal). Esto también se puede realizar tanto con los catéteres Foley como con el modelo Nuestadt/Aisch.

El globo es inflado, inicialmente, con 5 ml. de aire o suero salino. Entonces, es palpado y nuevamente inflado hasta que el globo se sienta apretado en el lumen uterino. Para esta maniobra es recomendable dar pequeños tirones al catéter para observar si hay deslizamientos.

Si el globo es inflado rápidamente o sobreinflado puede romper el endometrio y causar hemorragia. Esto, también puede llevar a la pérdida del medio hacia el ligamento ancho. El estilete es, entonces, removido totalmente y una pinza es colocada en el extremo posterior del catéter.

Hasta este momento las maniobras de las modalidades de recuperación por gravedad y por aspiración son iguales.

A continuación se describen los pasos con la primera de ellas para terminar con la descripción de la modalidad por aspiración que, es la que nosotros usamos actualmente.

Recuperación de embriones

1. Recuperación por gravedad con circuito cerrado de circulación.

Esta modalidad es útil particularmente en animales grandes. Se usa un catéter (de 2 vías), generalmente de calibre 18-20 (French). Se colocan aproximadamente 250 ml. de medio en un bulbo que se une al Foley a través de un tubo de teflón (tubo de entrada) de 50 cm de largo. La unión entre el Foley y el tubo se realiza a través de un conector de vidrio en forma de "T". El extremo libre de la T se une al tubo de salida que a la vez tiene una forma de "T" la cual lleva una jeringa de 50 ml. en el otro extremo (inferior).

El bulbo con el medio se ubican aproximadamente a 50-60 cm de altura desde la vulva. Los primeros 10-20 ml. de medio se hacen correr por el sistema sin que penetren al catéter. Esto se realiza para dejar el sistema libre de aire. Luego el tubo de salida es cerrado y el cuerno es llenado con medio de cultivo a través del tubo de entrada y del catéter (Figura N° 4).

En la modalidad descrita por Eldsen se recomienda mantener la unión útero-tubárica presionada con los dedos índice y pulgar para impedir la salida de líquido No parece necesario realizarlo ya que la cantidad de medio recuperado en esta modalidad alcanza casi al 100%.

Para tener una idea de cuánto es el tamaño del cuerno una vez llenado se dice que el cuerno de una vaquilla se distiende a un tamaño aproximado de una preñez de 35 días y el cuerno de una vaca se distiende a un tamaño de preñez de 45 días.

Una vez que no entra más medio al cuerno se cierra el tubo de entrada y el medio se agita vigorosamente con la jeringa con movimientos de succión. Se abre el tubo de salida y se colecta el medio por gravedad en un bulbo o probeta. Si aún quedara medio en el cuerno éste debe masajearse suavemente ("ordeña") para ayudar a su salida.

Una vez que la primera entrada de medio es recuperada el proceso se repite hasta que 500-800 ml. de medio hayan entrado al cuerno (5 a 8 lavados). La altura que se encuentra el bulbo con el medio permite al tejido uterino expandirse gradualmente a su máxima capacidad sin daño.

Cuando la colección termina el globo del catéter es desinflado y el catéter retirado. La colección en el otro cuerno sigue la misma modalidad. Algunos autores recomiendan no sacar completamente el catéter y colocar el estilete mientras la punta del catéter está en el cuerpo del útero. Debe tenerse mucho cuidado que la punta del estilete no pase a través de uno de los orificios del catéter ya que esto produciría, sin duda, una ruptura en el cuerno.

Una vez terminados los lavados de ambos cuernos se recomienda colocar una solución antibiótica dentro del útero (20-30 ml. aproximadamente) para prevenir endometritis. Para esto se usa una pipeta de inseminación y una jeringa. Si la técnica ha sido realizada correctamente creemos que no es necesario.

La temperatura del medio no es crítica, pero los shocks térmicos deben impedirse La esterilización con sustancias químicas, el lavado del material con jabón y agua de la llave, bacterias, etc. , pueden ser perjudiciales para los embriones.

Búsqueda de embriones

El medio colectado se deja decantar por 30 minutos aproximadamente para que los embriones que flotan en él puedan decantar. El medio que ha sido colectado en un bulbo se vacía abriendo la pinza inferior. Si ha sido colocado en probetas se aspira el sobrenadante usando una manguerita que se introduce en la probeta. Luego se procede a la búsqueda de los embriones en placas Petri o copas de vidrio y se clasifican bajo el microscopio estereoscópico.

Recuperación por aspiración interrumpida

Esta modalidad es una modificaicón de la anteriormente descrita. Se diferencia fundamentalmente en la cantidad de medio de cultivo introducido en el cuerno en cada lavado. Es muy simple y rápida de realizar una vez que se adquiere experiencia.

Una vez que el catéter está ubicado en el cuerno el medio de cultivo es introducido a través de una jeringa (25-50 ml) que se adosa al catéter. Se debe estar seguro que la cantidad de medio usado alcance todas las áreas del endometrio. Luego el medio es aspirado con la misma jeringa y depositado en cilindros de 500 ml o directamente en placas Petri o copas de vidrio.

Es importante estar seguro que el medio no es forzado dentro del cuerno con mucha presión. Una presión demasiado grande puede desgarrar el cuerno lo que resultará en hemorragia, pérdida del medio y de los embriones. El cuerno debe mantenerse lo más derecho posible para permitir que el medio fluya con facilidad.

Torcimientos del cuerno podrían resultar en desgarros por alta presión de líquido en pequeñas porciones del cuerno. Una distención moderada del cuerno es necesaria para realizar un buen lavado del endometrio. Debe tenerse presente que la poca o alta presión no son adecuadas. Debe existir un delicado balance entre ambas presiones (Figura N° 4).

TECNICA DE TRANSFERENCIA QUIRURGICA A TRAVES DE LA LAPARATOMIA LATERAL

Esta técnica, a pesar de haberse empleado por muchos años y ser practicada por diferentes grupos, recién fue publicada en el año 1979 (28).

Esta técnica no es difícil de realizar y no requiere demasiado equipo de cirugía Es necesario tener un brete protegido de la lluvia y que existan facilidades para mantener un grupo de animales. Un veterinario con un ayudante y 2 personas más pueden transferir 6 a 8 embriones por hora.

La receptora es colocada en un brete que permite posteriormente realizar la laparatomía lateral izquierda o derecha. Primero se procede a realizar un examen rectal para constatar la prsencia de CL.

La incisión paralela a la última costilla y de no más de 10 cm de longitud se realiza al lado ipsilateral del ovario que posee el CL, lo más posterior que sea posible (aproximadamente a una mano de distancia de las apófisis de las vértebras lumbares y a una mano del borde de la última costilla).

Los preparativos de asepsia de la operación son similares a la colección quirúrgica (corte de pelo en el área, lavado y desinfección). Se procede a inyectar anestesia local (xilocaína al 2%) por infiltración, también se puede usar anestesia paravertebral (L:1,2,3) y se incide la piel y las capas de tejido. El músculo oblícuo abdominal interno y el recto son separados con los dedos o una pinza roma.

Se procede a identificar nuevamente el CL (palpando los ovarios directamente en la cavidad abdominal). Muchas veces es posible identificar visualmente el ovarios a través de la incisión. Se exterioriza el cuerno de ese lado traccionando el ligamento ancho a la altura del tercio distal del cuerno. Para una mejor sujeción del cuerno se usan compresas de gasa entre los dedos pulgar e índice. El cuerno es puncionado cerca de la unión útero-tubárica con la parte roma de una aguja de sutura o estilete (sonda de pezón) hasta alcanzar el lumen. El estilete es retirado y el embrión es depositado en el lumen uterinao presionando cuidadosamente el émbolo de la jeringa. El catéter es retirado lentamente y el útero es devuelto a la cavidad abdominal. Debe tenerse cuidado de no dañar la mucosa, desgarrar el ligamento o producir rupturas. La herida operatoria puede ser suturada por capas (peritoneo, músculo , piel) o simplemente se sutura la piel (sutura simple) dejando las otras capas sin suturar. Esta última forma es muy rápida y no tiene mayores complicaciones para el animal.

TECNICA NO QUIRURGICA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Este método utiliza una pajuela de 0.25 o 0.5 ml y una pistola de Cassou para inseminación artificial. Recientemente este equipo ha sido modificado y se ofrece comercialmente en forma desechable y previamente esterilizado.

A continuación se describirá la técnica básica de Rowe con algunas modificaciones realizadas por el autor.

La receptora es ubicada en un brete y se procede a la palpación para identificar el ovario que posee el Cl. Esta oportunidad se aprovecha, en muchas ocasiones, para vaciar las heces del recto lo que facilitará el manipuleo del aparato reproductor y posteriormente la colocación del embrión.

Luego se coloca una anestesia epiddural baja (solución de xilocaína al 2%). La región perineal y vulva se lavan con jabón desinfectante y agua y se secan.

El embrión se coloca dentro de una pajuela esterilizada (0.25 - 0.5 ml) a la que se le ha cortado un extremo (aproximadamente 1.5. cm).

La colocación del embrión dentro de la pajuela se realiza de la siguiente forma:

a. Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo

b. Burbuja de aire

c. Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo

d. Burbuja de aire

e. Medio con el embrión

f. Burbuja de aire

g. Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo

La primera burbuja se hace tocar con el algodón y el alcohol polivinílico del extremo cerrado de la pajuela, esto sella un lado y no permite la salida del embrión antes de ser transferido.

La pajuela con el embrión se coloca dentro de la pistola de Cassou y ésta dentro de la pipeta plástica que, previamente fue esterilizada y cortada (aproximadamente 2 cm) para que calce con el largo de la pajuela, esto se realiza para no tener un extremo demasiado largo de plástico el que podría quebrarse o doblarse al pasar el cérvix con la consiguiente pérdida del embrión.

La pistola de Cassou se guarda hasta el momento de la transferencia en la misma bolsa plástica en que se esteriliza la pipeta plástica.

Antes de introducir la pipeta en la vagina se le coloca un lubricante estéril que permitirá pasarla más fácilamente a través del cérvix.

Con la mano izquierda el operador sujeta el cérvix a través de la pared del recto. La pipeta se introduce en el canal cervical y, posteriormente, el extremo se dirige y se ubica con ayuda de la mano izquierda en el cuerno ipsilateral al Cl. Toda esta manipulación debe ser muy suave. El embrión se deposita un poco más allá del cuerpo del útero. La pistola es removida suavemente y se retira la mano del recto. Todo este procedimiento debe realizarse lo más rápido posible. Si hay mucha demora en la operación la preñez será menor (29), lo que podría deberse a daño en la mucosa del útero por exceso de manipulación.

Para obtener un buen porcentaje de preñez, aparte de la destreza y experiencia con cualquiera de las técnicas descritas, es necesario que las receptoras sean animales sanos, que sus ciclos reproductivos hayan sido normales y que estén en buen estado de nutrición. En la medida que las receptoras estén en buenas condiciones, tanto sanitarias como nutricionales y reproductivas, la eficiencia de la transferencia de embriones, traducida en preñeces, será mayor.

La TE ha sido aplicada en Norteamérica a miles de hembras bovinas tanto de razas de leche como de carne. Una encuesta realizada en 1986 mostró que el número de

transferencias realizadas a través de esta técnica fue de 99.127 (30). Solamente en 1983 se realizaron aproximadamente 121.855 transferencias en forma comercial (31). Seidel (32) ha estimado que en el año 1990, en Norteamérica el número ascenderá a 250.000 preñeces.

En Latinoamérica el desarrollo ha sido más lento que en países más avanzados.

Hasta el año 1986 se habían efectuado aproximadamente 13.575 transferencias. Al parecer los mayores problemas de la transferencia en Latinoamérica han sido:

1. el costo,
2. la falta de profesionales entrenados y
3. la inseguridad de los criadores de invertir en la técnica, debido al poco o nada de retorno de su inversión (33).

Las ventajas principales de la TE son:

a. Acelera el progreso genético obteniendo mayor número de crías de hembras genéticamente superiores. Con esto la intensidad de selección a través de la hembra aumenta.

b. Acorta el intervalo generacional, pues la hijas obtenidas a través de transferencia pueden ser sometidas a tratamientos de superovulación y ser donantes de embriones nuevamente.

c. Permite realizar test de progenies de animales sospechosos de ser portadores de una característica no deseable y de realizar estudios de enfermedades genéticas.

d. Permite introducir nuevos genotipos a un país, sin mayores problemas de costos, utilizando el envío de embriones y no de los animales adultos.

e. Permite un mejor control de la enfermedades infecciosas. Uno de los mayores problemas de la importación y exportación de animales son los requerimientos de salud que exige cada país. Afortunadamente pareciera ser que los embriones no transmitirían muchas de las enfermedades causadas por virus o bacterias (34).

f. La técnica puede ser utilizada en otras áreas de investigación, como por ejemplo, en el estudio de la fertilización, implantación, muerte embrionaria, etc

g. Da la oportunidad de recuperar embriones de hembras incapaces de mantener una gestación y sirve muchas veces también como diagnóstico, tratamiento o pronóstico de algunas enfermedades reproductivas.

CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES

La preservación de embriones mamíferos a bajas temperaturas: "criopreservación", ofrece la posibilidad de ampliar las perspectivas de la transferencia de embriones y por ende la reproducción y producción animal. Potencialmente el hecho de poder preservar material genético por largos períodos de tiempo permitirá mantener bancos de embriones de animales de calidad genéticamente superior. El intercambio de material genético criopreservado entre los países evitará ciertos problemas actuales de costo de transporte, cuarentenas, transmisión de enfermedades adaptación, etc. Se podrán conservar embriones de especies y razas en extinción. Los embriones podrán ser utilizados en diferentes lugares y condiciones lo que permitirá el estudio de adaptaciones de nuevas razas o líneas genéticas. Muchas veces el número de embriones recuperados de una donante excede el número de receptoras disponibles, la posibilidad de poder conservarlos congelados es de gran valor para el ganadero (35). La criopreservación de embriones, además ha permitido estudiar los aspectos fundamentales de las bases de criobiología. Esto se ha debido a que los embriones son más grande en tamaño, cuando se comparan con células de otro tipo. Fuera de estas ventajas se podrían indicar muchas otras, pero es de todos conocidos que de todas formas la ventaja principal radica en la aplicación práctica de la ganadería.

Los trabajos iniciales de congelación realizados con embriones de lauchas demostraron que la taza de enfriamiento, calentamiento (descongelación) era muy importante para obtener una alta taza de sobrevivencia embrionaria (36).

Los principios básicos de la criopreservación son muy complejos y envuelven procesos físico-químicos de transporte de agua y temperatura entre la célula y el medio que la rodea.

Un enfriamiento óptimo es aquel cuya velocidad es lo suficientemente lenta para prevenir la formación de cristales intracelulares y lo suficientemente rápida - para minimizar la exposición de la célula a altas concentraciones de soluto.

Bajo este principio es lógico pensar que para cada tipo de célula existe una velocidad de enfriamiento óptima que permite la sobrevivencia de las células que han sido congeladas/descongeladas.

Se considera que los dos factores más importantes que están involucrados en el - daño que produce la congelación son: "el efecto de solución", es decir, la exposición de las células aún no congeladas a altas concentraciones de sales por largo períodos de tiempo, y "la formación de cristales de hielo intracelulares", - debido a la deshidratación inadecuada de las células.

El efecto de solución daña la célula cuando la velocidad de enfriamiento es más lenta que la óptima, y los cristales de hielo intracelulares se forman cuando la velocidad de enfriamiento es más rápida que la óptima. Se ha observado que estos cristales de hielo dentro del citoplasma son el factor primario responsable de la muerte de la célula durante la congelación.

El punto de congelación de cualquier solución disminuye a medida que la concentración de moléculas en ella aumenta. Por ejemplo, el punto de congelación de - una solución acuosa de 0.165 M de NaCl (isotónico) que contiene una concentración de 1.0 M de glicerol es de -1.9 °C y la de 3.0 M de glicerol es de -8.1 °C. Esto demuestra que el hielo no se formará en estas soluciones hasta que ellas no sean enfriadas bajo sus respectivos puntos de congelación, dependiendo también del volumen de la solución a enfriar, por ejemplo, un volumen aproximado de 0.5 ml de una solución isotónica de NaCl puede estar superenfriada hasta 10 o 15 veces bajo el punto de congelación. Este fenómeno se conoce como "superenfriamiento" (supercooling) y juega un rol crítico en la sobrevivencia de las células a congelar , especialmente en los embriones. El superenfriamiento puede prevenirse a través de la inducción artificial de la formación de cristales de hielo en la solución, lo que se conoce como "seeding" de la muestra. Este se realiza con un pequeño cristal de hielo o con una pinza previamente enfriada. El seeding se debe efectuar cerca del verdadero punto de congelación de la solución que rodea al embrión. Mientras no se produzca el seeding el embrión no puede comenzar ha deshidratarse.

Los cristales de hielo que se forman en el medio que rodea a las blastómeras (embrión) son prácticamente de agua pura por lo que la solución entre los cristales se torna más salada y no se congela debido a la alta concentración de moléculas. Esta fase se torna más hipertónica que el fluído que hay en las blastómeras (embrión) por lo que éstas comienzan a perder agua (deshidratación). Si la temperatura continúa bajando lentamente más cristales de hielo se formarán y más hipertónico se hará el medio y en esta forma el embrión continuará respondiendo con la consecuente pérdida de agua; así se previene la formación de cristales grandes de hielo en las blastómeras. La deshidratación debe de tenerse que no sea dañina para la viabilidad celular. Para ello se sumerge la muestra directamente en N2 L ("plunging").

Para que sobrevivan a la criopreservación los embriones mamíferos deben estar suspendidos en un medio que contenga un crioprotector. Algunas de éstas sustancias que han demostrado ser adecuadas como protectores de embriones son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros, en concentraciones que van entre otros, en concentraciones que van entre 1.0 a 2.0 M. Estos crioprotectores deben tener algunas características como: alta solubilidad, baja toxicidad a altas concentraciones y un bajo peso molecular, para permitir una permeabilidad fácil y ejercer el máximo efecto coligativo.

Los crioprotectores parecen proteger contra el efecto de solución más que contra la formación de cristales de hielo intracelulares. En todo caso su mecanismo de acción es pobremente conocido.

Se ha demostrado que el glicerol y el DMSO protejen en base a la molaridad, es decir, que actuarían reduciendo la concentración electrolítica de la solución - que aún no está congelada alrededor de la célula a cualquier temperatura.

Durante la adición o dilución de un crioprotector permeable (es decir que penetra a las blastómeras) como el glicerol, la célula tiene cambios osmóticos. Inicialmente, al colocar el embrión en la solución con el crioprotector éste disminuirá en tamaño por la pérdida de H_2O debido a que el embrión es más permeable al agua que el crioprotector. Esto continuará hasta que la salida de agua se equilibre con la entrada del crioprotector, luego el agua penetrará al embrión nuevamente y las blastómeras gradualemente aumentarán su volumen. El equilibrio ocurre cuando el volumen del agua del embrión alcanza nuevamente su volumen isotónico. La temperatura tiene un efecto en este equilibrio, así se ha visto que el equilibrio ocurrirá más rápido a 37° C que a temperaturas menores. Lo contrario a este proceso ocurre cuando el crioprotector se remueve (esto se verá más adelante).

Cuadro N° 5

ALGUNOS EJEMPLOS UTILIZANDO 1.5M de GLICEROL COMO CONCENTRACION FINAL DE EQUILIBRIO.

4 etapas	3 etapas	2 etapas	1 etapa
0.25M (5-10 min)			
0.50M (5-10 min)	0.5M (5-10 min)		
0.75M (5-10 min)	1.0M (5-10 min)	0.75M (5-10 min)	
1.5 M (5-10 min)	1.5M (5-30 min)	1.5M (10-30 min)	1.5 M (10-30 min)

Como se ha comentado anteriormente los crioprotectores de alguna forma disminuyen el daño durante el enfriamiento y congelación de los embriones, sin embargo también causan daño celular por injuria osmótica. Rutinariamente los embriones son colocados en soluciones que contienen el crioprotector en concentraciones crecientes para impedir el shock osmótico. Generalmente esto se realiza en 3 etapas a temperatura ambiente (0.5M, 1.0 M y 1.5 M). Sin embargo, investigaciones más recientes han indicado que los embriones (blastocistos bovinos por ejemplo) soportan este shock osmótico ("encogimiento, contracción - shrink") al ser colocados directamente en una solución de 1.5 M de glicerol en PBS (Cuadro N°5)

Para el enfriamiento de la muestra se utilizan diferentes tipos de freezers biológicos y diferentes técnicas.

Se distinguen en la práctica dos esquemas básicos para la criopreservación de embriones mamíferos: A) "enfriamiento rápido" y B) "enfriamiento lento" ("fast y slow" cooling). Sus denominaciones de "rápido" y "lento" no corresponden a la interpretación (al menos al traducirlo del inglés al español) de lo que quisiéramos entender por rápido y lento, ya que la velocidad de enfriamiento para ambos casos es la misma. Sin embargo, lo que cambia es la temperatura final de enfriamiento a la cual se llega. Esto probablemente, entre otras cosas, hace cambiar el estado relativo de la deshidratación de los embriones cuando se llega al punto de congelación intracelular (a menor temperatura más agua es removida, resultando en menor cantidad de hielo intracelular) y cambia la forma de descongelar las muestras. (Cuadro 6). Recientemente se han desarrollado otras técnicas que no corresponden, en gran medida, a los esquemas mencionados. Estas técnicas serán mencionadas más adelante.

Cuadro N° 6

	ENFRIAMIENTO LENTO	ENFRIAMIENTO RAPIDO
Velocidad de enfriamiento	lento 1 - 0.3°C/min	lento 1 - 0.3°C/min
Temperatura final de enfriamiento	aprox. -30°C, -40°C	aprox. -60°C,-100°C
Descongelación	rápida aprox.500°C/min.	lento 4°C-25°C/min.

* Esta frecuencia de calentamiento se alcanza colocando la muestra en un baño de agua a 37°C por pocos segundos.

En general , la técnica clásica de Willadsen y Col (37) consiste en agregar un crioprotector (por ejemplo glicerol , dimetilsulfóxido) en concentraciones de 1.0 a 2.0 molar a un medio de cultivo (fosfato buffer salino, PBS). Los embriones pueden ser colocados directamente en esta solución o en pasos sucesivos en concentraciones crecientes hasta alcanzar la concentración final. Luego son envasados en pajuelas o ampollas de vidrio y enfriados a 1°C x min. hasta-5° a -7° C. A esta temperatura se induce la formación de cristales de hielo, "seeding" - luego se continúa con una frecuencia de enfriamiento de 0.3 - 0.5°C x min. hasta alcanzar los -30°a -40°C. A esta temperatura el enfriamiento se detiene y los embriones son sumergidos directamente en N_2 líquido (36).

Los embriones enfriados hasta -60°C (antes de ser sumergidos en N_2 L) a una velocidad de enfriamiento de 0.1°C/min., requieren ser descongelados a una velocidad de calentamiento lento (ej.: 10°C/min). Estas técnicas se basan en los trabajos originales de Whittingham y col (39) y Wilnut (40). Sin embargo, en la actualidad se prefiere la técnica clásica de Willandsen (37) la cual se diferencia fundamentalmente de las anteriores en que los embriones son sumergidos en N_2L a temperaturas relativamente altas (ej.: -30°C, -40°C) y utiliza velocidades de enfriamiento de 0.1°C a 0.3°C/min.

Esto combinado con velocidades de calentamiento rápido(300 500°C/min) para la descongelación. De esta técnica existen un sin número de variaciones, pero la base es la misma.

Las técnicas de descongelación que se describen a continuación son representativas de las metodologías para embriones bovinos en estado de mórula o blastocito que han sido enfriados y congelados con velocidades de enfriamiento de 0.1°-0.3°C/min y sumergidos en N_2L a -30°C, -38°C y mantenidos en N_2L a -196°C.

Hay que tener presente que la temperatura del agua donde se descongela la muestra varía de acuerdo al envase en que se colocan los embriones en la congelación, por ejemplo, las pajuelas de plástico francesas de 0.5 ml, 0.25 ml y las ampollas de vidrio deben ser descongeladas a temperaturas diferentes ya que la proporción de superficie/volumen de la muestra no son iguales. Debe tenerse presente además, que la agitación del agua o de la muestra en el agua hace variar también la velocidad de descongelación.

Como es ampliamente conocido, en ausencia del crioprotector (por ejemplo: glicerol, DMSO) los embriones de mamíferos no sobreviven a temperaturas más bajas de -20°C a velocidades de enfriamiento que permiten una deshidratación osmótica adecuada (0.1-0.3°C/min). Sin embargo, el crioprotector es tóxico si se deja en contacto con los embriones por mucho tiempo (más de 30' aprox.) y debe ser removido del embrión una vez que éste es descongelado.

Es esencial entonces sacar el crioprotector sin causar daño osmótico al embrión. Actualmente existen básicamente dos métodos: A) el método clásico en etapas, utilizando soluciones decrecientes del crioprotector,B)método de dilución en 1 etapa utilizando sucrosa/PBS.
Para ambos métodos las muestras son descongeladas en un baño de agua a 37°C. En el caso de usar pajuelas francesas, éstas son agitadas para que la temperatura se distribuya homogéneamente.

Para remover el crioprotector se recuperan los embriones desde la pajuela en la siguiente forma:

1. Al utilizar concentraciones decrecientes del crioprotector (glicerol) éstas concentraciones disminuyen en aproximadamente 0.25M en cada solución. Los embriones son colocados en cada una de éstas soluciones por 5-10 minutos a temperatura ambiente hasta alcanzar la solución de PBS. Se pueden utilizar diferentes números de diluciones, por ejemplo: 6, 3, etc.

Al utilizar 6 etapas los embriones pasan por las siguientes diluciones de glicerol/PBS: 1.5 M, 1.25 M, 1.0 M, 0.75 M, 0.5 M, 0.25 M y PBS.

2. Al utilizar el método de dilución sucrosa/PBS la concentración de sucrosa debeser isoosmolar con la concentración de glicerol o un poco más baja que ésta. El volumen de las soluciones debe ser en una relación de aproximadamente 10:1 cuando

la solución de sucrosa es colocada dentro de la pajuela, o de lo contrario si los embriones son colocados en una placa petri, ésta debe tener un volumen adecuado de medio de sucrosa/PBS. Los embriones son dejados en este medio por 5 10 minutos a temperatura ambiente para su equilibrio y luego pipeteado a un medio de PBS suplementado en 10% - 20% de suero fetal.

Se calcula que en el año 1986 el 17% de los embriones transferidos en Norteamérica en forma comercial han sido embriones criopreservados (30). En Latinoamérica la cifra alcanza al 1% (33).

En los últimos años las técnicas de congelación y descongelación de embriones de mamíferos han sido simplificadas y seguramente en un futuro cercano la metodología será similar a las que se usan para el semen. Es así como el uso de la sucrosa para extraer el glicerol del embrión antes de ser transferido ha sido utilizada en trabajos de campo sin la necesidad de utilizar la evaluación microscópica de los embriones (42).

Algunas investigaciones han demostrado que los embriones pueden ser deshidratados a temperatura ambiente y posteriormente ser colocados directamente a -35°, -60°o -196° C. Esto ha sido posible utilizando una combinación de glicerol/sucrosa en diferentes concentraciones antes de ser congelados (43). Otros autores han reportado el haber obtenido preñeces con embriones bovinos sometidos a vitrificación (45). La vitrificación es la solidificación de un líquido producido por una elevada viscosidad durante el proceso de enfriamiento de tal forma que la solución pasa a un estado de vidrio (46).

La congelación de embriones, especialmente bovinos, necesita de más investigación y su mayor aplicación dependerá de la facilidad de los métodos y resultados obtenidos Sin duda alguna, en un futuro cercano será masivamente utilizada y será la forma preferida del movimiento de material genético entre los países.

FERTILIZACION IN VITRO

Como se comentó anteriormente, uno de los problemas mayores de la TE es la limitante de la pequeña cantidad de oocitos que se producen con los tratamientos de superovulación empleados. Sin embargo, cada ovario contiene miles de oocitos al nacimiento que podrían recuperarse y utilizarse como fuente de producción de embriones si se fertilizan in vitro (IVF).

Las primeras crías que se obtuvieron por IVF provenían de oocitos de coneja (47). Después de este gran acontecimiento la IVF se ha aplicado a oocitos de diferentes especies. El mayor número de crías se ha obtenido de conejas, lauchas y humanos.(48)

Uno de los acontecimientos más sensasionales de la última década en reproducción, y que más impacto tuvo en todo el ámbito mundial, fue el nacimiento de Louise Brown en julio de 1978, el primer bebé obtenido en el laboratorio a través de IVF (49). Actualmente, decenas de niños han nacido por esta técnica en el mundo y no solamente así, sino de embriones que han sido fertilizados in vitro, congelados y descongelados y transferidos a mujeres.

Se cree que el aspecto más difícil en la IVF es lograr la capacitación espermática Sin ella los espermios son incapaces de fertilizar los oocitos. Afortunadamente la la capacitación se ha logrado in vitro en varias especies.

La técnica de la IVF requiere de gran atención en cada una de las etapas. Además, se necesita de mucha destreza en la técnica de laboratorio y tiempo para realizarlas La asepsia en la metodología debe extremarse.

A pesar que la capacitación espermática es una de las dificultades que tiene la técnica, también el cultivo para la maduración de los oocitos y el cultivo para su desarrollo in vitro de éstos es también un impedimento.

Actualmente el paso de 8 células al estado de blastocisto se realiza en cultivo in vivo, utilizando el oviducto de la coneja u otro animal. Investigaciones recientes han indicado que este paso puede realizarse en cultivo in vitro (Yshioya, comunicación personal).

Los procedimientos de la IVF en animales de granja han sido discutidos por varios autores (46, 50, 51). En 1982 se reportó el primer nacimiento de una cría, en ganado bovino (52). Un trabajo reciente reportó el nacimiento de una cría de coneja que fue obtenida a través de la introducción de un espermio dentro del óvulo (53). Los resultados obtenidos basados en número de crías nacidas no han sido buenos. Sin embargo, tomando en consideración otros criterios de fertilización los resultados parecieran ser mejores. Lamentablemente, estos criterios se basan fundamentalmente en la división del oocito (estado de 2 células), pero la fragmentación celular y la división partenogenética son difíciles de distinguir de una división mitótica real, por fertilización.

La mayoría de las crías producidas en las especies domésticas por IVF han provenido de oocitos maduros recuperados in vivo (Cuadro N°7)

CUADRO N° 7

ESPECIE	COLECCION	MADURACION	RESULTADO	REFERENCIA
Bovino	in vivo	in vivo	cría	52
	in vivo	in vitro	cría	54 - 55
	in vitro	in vitro	cría	56
	in vitro	in vitro	blastocisto	Del Campo M.R*
Suino	in vivo	in vivo	cría	57
Caprino	in vitro	in vitro	cría	57

Seguramente la aplicación de la IVF en animales de granja tomará algunos años. Sin embargo, la potencialidad de su uso en la reproducción es incalculable. Por ejemplo se podrían fertilizar oocitos obtenidos de una sola superovulación con espermios provenientes de diferentes toros. Podrían mantenerse stocks de oocitos en congelación para ser fertilizados en el futuro. Además, en combinación con otras biotecnologías seguramente, llegará a ser más útil de lo que hoy día se preveé.

SEXAJE PRENATAL

El poder realizar un diagnóstico prenatal del sexo ha hecho que diferentes laboratorios investiguen intensamente en esta área.

Variadas técnicas están siendo desarrolladas al respecto, pero no hay duda que lo ideal será poder determinar el sexo de los embriones antes de la fertilización.

Entre las técnicas citológicas que se usan para determinar el sexo de los embriones están el análisis de los cromosomas a través de biopsias tomadas de los embriones en estado de mórula o blastocisto. Lamentablemente, es una técnica relativamente complicada para s. r aplicada en terreno, pero si bien es cierto, el diagnóstico es bastante seguro, sólo el 60% de los embriones pueden ser sexados (58) debido a que a veces los cromosomas sexuales no son claramente distinguidos. Desafortunadamente la preñez disminuye debido al procedimiento empleado en esta técnica (59).

Las técnicas de dividir el embrión a través de microcirugía y congelar una mitad para su posterior transferencia ha abierto una nueva posibilidad en el sexaje. Algunos autores han obtenido un 60% de preñez con estas mitades de embriones previamente sexadas y transferidas directamente a receptoras y un 23% con la otra mitad que fue congelada/descongelada y transferida posteriormente (60).

La demostración del antígeno de histocompatibilidad que es específico de las membranas de las células macho (antígeno HY) es otra de las técnicas usadas para sexar embriones. En embriones de lauchas y bovinos la seguridad ha sido del 80% (61 62, 63). En general, el método consiste en producir un anticuerpo en contra del antígeno H-Y. Estos anticuerpos se unen a las membranas de las células de los embriones machos, pero no a los embriones hembras. Existen 2 modalidades para detec

*Aún no publicado

tar los anticuerpos : A) agregando un complemento, pero éste mata a los embriones machos y B) agregando un segundo anticuerpo que lleva unida una molécula fluorescente. En este caso, al observar la muestra en un microscópio se observa que los embriones macho brillan. Desafortunadamente no todos los embriones macho producen el brillo con la misma intensidad, lo que hace el diagnóstico un tanto subjetivo.

Otras técnicas que se han empleado últimamente para determinar el sexo después de la fertilización son las que tienen relación con la determinación de la actividad metabólica de los embriones (64) y la prueba específica del DNA del cromosoma Y (65). A pesar que esta última tiene la limitante de la necesidad de la toma de una biopsia de los embriones, los estudios preliminares muestran que existe un 95% de seguridad en embriones de 7 y 8 días de edad.

Quizá, en el futuro cercano el sexaje será empleado como otra biotécnica en el ganado bovino. Hoy día el costo es demasiado alto para emplearlo en algún programa y además, incierto. A pesar que algunas compañías lo ofrecen comercialmente, el ganadero debe estar consciente de qué quiere antes de solicitar dicho servicio.

PRODUCCIÓN DE MELLIZOS Y MULTIPLES

Existen diferentes procedimientos para hacer mellizos: A) separación de las blastómeras de un embrión de dos células y B) microcirugía de un embrión en estado de mórula o blastocisto. En el primer caso, las células son cultivadas in vitro o in vivo (66, 67). La técnica también ha sido utilizada para producir cuádruples en ovejas, tríples en bovinos y mellizos en cerdas y yeguas (67).

La sobrevivencia de mellizos idénticos es relativamente alta, pero no ocurre así al intentar la producción de cuádruples y prácticamente no ha habido desarrollo a término al intentar la producción de óctuples. Sin embargo, se han obtenido quíntuples idénticos de ovejas mezclando blastómeras de un embrión en estado de 4 células con blastómeras de un embrión en estado de ocho células (ver quimeras más adelante). Se cree que las blastómeras obtenidas del embrión de cuatro células formarían la placenta y las obtenidas del embrión de ocho células formarían el feto (66). Esto es sumamente interesante desde el punto de vista experimental, pero obviamente también tiene múltiples aplicaciones prácticas.

La división de un embrión por microcirugía es un procedimiento más simple para producir mellizos idénticos (68, 69, 70) y en forma muy general consiste en la división de un embrión en dos mitades, estas mitades han sido colocadas en zonas pelúcidas vacías y luego transferidas.

Se ha indicado que en estados más avanzados la colocación de las mitades de embriones en zonas pelúcidas, no se hace necesario, lo que simplifica aún más la técnica (71). Todo este procedimiento no toma más de 10 minutos por embrión, sin embargo, es necesario tener presente que se necesita equipos sofisticados y personal muy bien entrenado. El porcentaje de preñez obtenido ha sido aproximadamente 50% por mitad de embrión transferido, lo que equivale a obtener 50% más de preñeces que si se transfiere el embrión original. Aproximadamente la mitad de las crías nacidas son mellizos idénticos (71, 72). En un cálculo teórico se puede apreciar que si se obtienen 200 mitades de embriones partiendo 100 embriones, el número de receptoras preñadas será de 100 (50% preñez).

Los mellizos idénticos producidos en forma natural o artificial (microcirugía) son un ejemplo de cloning se define en forma estricta como un trasplante nuclear (73).

Teóricamente se podrían producir cientos de individuos idénticamente iguales transplantando el núcleo de células somáticas a oocitos recientemente fertilizados a los cuales se les retirarían ambos pronúcleos (Masculino y femenino). Hasta la fecha no ha sido posible obtener copias de un adulto a partir de transplante de un núcleo diploide de células somáticas. En cambio, el transplante nuclear ha sido exitoso al utilizar un ovum de laucha en estado de una célula

y un núcleo de una célula embrionaria (73). Esto es un clone a partir del embrión pero no de un adulto, el valor genético que tendría esto deberá ser determinado ya que lo importante y valioso sería producir un clone a partir de un núcleo obtenido de un animal adulto genéticamente superior. Esta técnica combinada con el sexaje, la criopreservación y la transferencia podrían ser de mucha importancia en la ganadería del futuro.

Otra técnica para producir clones ha sido descrita por Hope e Illmensee (74), quienes trabajaron en lauchas. En este caso uno de los pronúcleos (femenino o masculino) es removido por microcirugía. La condición diploide del embrión es reconstituída colocándolos con citoclasina B, que previene la división celular del embrión al estado de 2 células, pero no previene la síntesis de DNA ni la división nuclear Al retirar la citoclasina B del citoplasma comienza la división celular y el embrión continúa su desarrollo. Estos embriones son completamente homocigotos (100% consanguíneos). Solamente pueden producirse hembras con esta técnica, ya que la constitución YY resulta en muerte embrionaria temprana (75).

QUIMERAS

Existen diferentes métodos de producir quimeras, el más común es colocar juntas, blastómeras provenientes de 2 embriones. Otro método es inyectar blastómeras de un embrión dentro del blastocele de otro embrión. Actualmente no hay posibilidad de que las características genotípicas seleccionadas puedan ser incorporadas dentro del embrión. Desafortunadamente, los tejidos de las quimeras se desarrollan al azar de cada embrión y las contribuciones no son iguales. Ambas técnicas han sido exitosas en ovejas (76,77) y vacas (78).

Esta técnica es más bien de importancia práctica en la transferencia interespecífica o en especies en extinción que desde el punto de vista de la genética (79, 80). Sin duda se necesita mayor investigación en esta área.

MODIFICACION O INTRODUCCION DE DNA - PRODUCCION DE ANIMALES TRANSGENETICOS

Casi en forma simultánea 2 grupos de investigadores lograron inyectar DNA para la beta globulina de conejo (81) y para la hormona de crecimiento de rata dentro del pronúcleo de un embrión de laucha al estado de 1 célula (82). En algunas circunstancias este DNA fue incorporado dentro del código genético de la ova de laucha expresándose y transmitiéndose a las siguientes generaciones.

Posteriormente a estos trabajos, los investigadores han dirigido sus esfuerzos con la idea de producir animales transgenéticos que vayan en beneficio de los humanos especialmente que ayuden a la alimentación en el futuro (83, 84).

Los científicos y ganaderos han visto en esta tecnología una aplicación práctica difícil de predecir ya que producirá cambios fundamentales en la genética. El interés mayor radicaría en el aumentar el crecimiento, la calidad, la producción y mejorar la reproducción y la resistencia a las enfermedades.

La aplicación de la transferencia de genes depende de la identificación y aislación de los genes realmente útiles y su incorporación dentro del código genético de otro animal (85). Existen problemas de técnica,como la dificultad de visualizar el pronúcleo en los embriones bovinos. Al respecto no hay duda que esta tecnología será una herramienta poderosa en la industria animal. No obstante, no habría que descuidar los aspectos éticos y sociales que ésta pudiera acarrear.

CONSIDERACIONES FUTURAS

El desarrollo de las biotecnologías en general asociadas a la TE ofrecen muchas más oportunidades que problemas y todos debemos estar conscientes que éstas serán aplicadas en mayor escala en un futuro cercano. Nosotros como profesionales debemos

aceptar esto como un hecho . Desde ya muchos de nuestros países están importando embriones congelados y éstos están siendo transferidos en hembras nacionales. La TE se aplica cada día más y más profesionales adquieren entrenamiento para ello. Lamentablemente la investigación en Latinoamérica en general es limitada en lo que se refiere a biotécnicas relacionadas con la producción animal.

La posibilidad de importar/exportar embriones de un continente a otro con los riesgos mínimos de transmisión de enfermedades nos da la posibilidad de traer material genético o exportar embriones sin el problema de deshacerse de las hembras Sin duda, la manipulación de embriones (congelación, micromanipulación) deben ser realizada con el máximo cuidado para evitar riesgo de la contaminación de los mismos.

Las técnicas que permitirán la identificación prenatal del sexo, la producción de quimeras, trasplante nuclear, la microinyección de espermios, la congelación de material genético, la manipulación de los genes, la introducción de DNA, etc.,tendrán una aplicación práctica que es difícil imaginar y predecir en la reproducción animal.

El progreso que se ha hecho en la última década ha sido espectacular, el progreso que se realizará en el futuro no tiene límites imaginables.

SUMMARY : NEW TECHNOLOGIES IN ANIMAL REPRODUCTION: BASIC ASPECTS AND APPLICATIONS

The purpose of this paper is to comment the biotechnologies of animal reproduction, mainly those related to bovine. Among these oestrus cycle syncronyzation , superovulation, embryo transfer, cryopreservation, production of multiples through blastomeral culture and microsurgery are mentioned. Other techniques of future application will be briefly commented,. for example sex determination, in vitro fertilization and production of transgenetic animals.

Durely all these techniques will contribute to aliviate nourishment problems, to improve life standard of people, especially in developed or underdeveloped countries.

The progress that has been attained in the last decade is wonderfull, the progress to be attained in the future has not imaginable limits.

BIBLIOGRAFIA

1. MONNIAUX, D.,Chupin, D. Saumande, J. Superovulatory responses of cattle.---- Theriogenology 1983; 19: 55 - 82.

2. MURPHY, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J,, Humphrey, W.D. Variability in ---- gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response.-- Theriogenology 1984; 21: 117 - 125.

3. LINDSELL, C.E., Rajkumar, k., Manning, A.W., Emery, S.K., Mapletoft, R.J., - Murphy, B.D. Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially-available gonadotrophins. Theriogenology 1986; 25:167.

4. LASTER, D.B Disappearance of and uptake of (125 I) FSH in the rat, rabbit, - ewe and cow. J. Reprod. Fertil. 1972; 30:407 - 415.

5. GONZALEZ-MENCIO, F., Manns, J., Murphy, B.D. FSH and LH activity of PMSG --- from mares at different of gestation. Anim. Reprod. Sci. 1978; 1:137-144.

6. SCHAMS, D., Menzer, D., Schallenberger, E., Hoffmann, B., Hahn, J.,Hahn, R.- Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on --- endocrine responses after application for superovulation in cattle. In:- Sreenen J.R., ed Control of Reproduction in the Cow. The Hague: Martinus Nijhoff, 1977: 122 - 142.

7. CHUPIN, D., Saumande, J. New attempts to decrease the variability of ovarian response to PMSG in cattle. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 1979; 19:-- 1489 - 1498.

8. WANG, H., WU, XU, K., Hagele, W.C., Mapletoft, R.J. Control of superovulation in the cow with a PMSG antiserum. Theriogenology 1987; 27:291

9. LINDSELL,C.E., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J. Superovulatory and endocrine -- responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the of -- the estrous cycle. Theriogenology 1986; 26: 209 - 219

10. MAPLETOFT, R.J., Gonzalez, A., Lussier, J.G., Murphy, B.D., Carruthers, T.D. Superovulation with Folltropin in beef heifers - Part I. Theriogenology- 1988; 29 (in press).

11. PAWLSHYN, V., Lindsell, C.E., Braithwaite, M. Mapletoft, R.J. Superovulation of beef cows with FSH-P: a dose response trial. Theriogenology 1986; 25: 179.

12. LERNER, S.P. Thayne, W.V., Baker, R.D., Hensche, T., Meredith, S., Inskeep,- E.K., Dailey. R.A., Lewis, P.E., Butcher, R.L. Age, dose of FSHand other factors affecting superovulation in holstein cows. J. Anim. Sci. 1986;-- 63: 176 - 183.

13. ELDSEN, R.P., Kessler, R.M. Superovulation of Nelore cows and heifers. ---- Theriogenology 1983; 19: 127.

14. LINDSEL, C.E., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J. Superovulatory and indocrine -- responses in heifers trated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. Theriogenology 1986; 26: 209

15. HASLER, J.F., Mc Cauley, A.D., Schermerhorn, E.C., Foote, R.H. Superovulatory responses of holstein cows. Theriogenology 1983; 19: 83 - 99.

16. MASSEY, J.M., Oden, A.J. No seasonal effect on embryo dennor performance in- the southwest region of the U.S.A. Theriogenology 1984; 21: 196 - 217.--

17. ELSDEN, R.P. Embryo collection by surgical methods. In: Betteridge, K.J., ed. Embryo transfer in farm animals. Ottawa: Agriculture Canadá 1977; mono-- graph 16: 10 - 13.

18. ROWE, R.F., Del Campo, M.R., Eilts, C.L., French, L.R., Winch, R.P., Ginther, O.J. A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from - cattle. Theriogenology 1976; 6: 471 - 484.

19. DROST, M., Brand, A., Aarts, M.H. A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. Theriogenology 1976; 6: 503 - 508.

20. Manual of the internarional embryo transfer society. Section IV: Sanitary -- procedures for commercial recovery, handling and transfer of embryos. -- Champaign, IL: International Embryo Transfer Society 1987: 22 - 43.

21. HAGELE, W.C., Maker, J.S. and Mapletoft, R.J. The effect of Ethylene oxide -- gas sterilization of semen. Straws or mouse. Embryo survival in vitro.

22. DEL CAMPO, M.R. Clasificación y evaluación morfológica de oocitos bovinos. En Compendio Curso Relaciones Materno - Fetales y Transferencia de Embriones. Ed. Del Campo, C.H. Valdivia, Chile. 1984; pág. 429.

23. LINDNER, G.M., Anderson, G.B., Bon Durant, R.H., Cupps, P.t. Survival of bovine embryos stored at 4 c. Theriogenology 1983; 20: 311 - 320.

24. LEIBO. S.P.; Winninger, D. Production of bovine pregnancies from embryos --- transported al 0C by air. Theriogenology 1986; 25: 165.

25. ROWE, R.F., Del Campo, M.R., Crister, J.K., O.J. Embryo transfer in cattle. - Non surgical collection techniques. Am. J. Vet. Res. 1980; 41: 106 - 108.

26. SCHEIDER, V., Hahn, J. Bovine embryo transfer in Germany. Theriogenology 1979; 11 (1), 63 - 80.

27. ELSDEN, R.P., Hasler, J.F., Seidel J.R., G.E. Non surgical recovery of bovine egg. Theriogenology 1976; 6: 503 - 532.

28. EVANS, J.F., Hesseltine, G.R., Kennedy, R.M. Standing paralumbar apprach for-

29. ROWE, R.F., Del Campo, M.R., Crister, J.K., Ginther, O.J. Embryo trasnfer in-cattle. Non surgical transfer. Am J. Vet. Res. 1980; 41: 1024 - 1028.

30. KRAHMER, D.C. Current status, advantages and potencial applications of Embryo transfer in relatio to animal production and/or species preservation in - North America. En Proceedings of a symposium. International Embryo Move-- ment XXXIII World Vet. Cong. Montreal, 1987: 63.

31. EMBRYO TRANSFER NEWSLETTER. 1984.
Surveys of International enbryo transfer Industry. Vol. 3, Nº 3 : 7.

32. SEIDEL, G.E. Applications of embryo transfer and related technologies in --- cattle 1984; J. Dairy Sci. 67 : 2786.

33. DEL CAMPO, M.R. and Del Campo, C.H. Advantages and Potencial Applications of embryo transfer in relation to animal production and/or species preservation in Central and South America; the West Indies. En Proceedings of -- a syposium: International Embryo Movement: XXXIII World Vet. Cong. Mon--- treal, 1987: 55.

34. SINGH, E.L. Disease Transmision: Embryo Pathogen interactionsin cattle. 1984. X Congreso Int. de Repro. Animal e I. A. Urbana, Illinois, U.S.A. IX-17.

35. FOOTE, R.H. New developments in embryo transfer and related technology. 1982; Holstein Sci. report. 1.

36. WHITTINGHAM, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P. Survival of mouse embryos to - 196- and 269C. Science 1972; 178/411 - 414.

38. DEL CAMPO, M.R. Congelación de embriones bovinos, resultados premiliminares. Arch. Med. Vet. 1984; 15: 51.

39. WHITTINGHAM, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. Survival of mouse embryos frozen to- 196 and -269C. Science, 1972; 178: 411 - 414.

40. WILLMUT, I. The low temperature preservation of mammalian embryos. J. Reprod. Fertil. 1972; 31 : 513.

37. WILLADSEN, S.M., Polge, C. and Rowson, L.E.A. The viability of deepfrozen cow embryos. J. Reprod. Fert. 1977; 52: 391.

41. LEIBO, S.P., Mazur, P. Methods for the preservation of mammalian embryos by - freezing, In: Daniel J.C. Jr., ed. Methods Mammalian Reproduction, New -- York: Academic Press, 1978; 179 - 201.

42 LEIBO, S.P. Field Trial of one-step frozen bovine embryos transferred nonsurgically Theriogenology 1983; 19 : 139.

43. MASSIP, A. Van DerZZwalmen, P. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerolsucrose. Vet. Rec. 1984; 115: 327 - 328.

44. RALL, W.F., Fahy, , G.M. Vitrification: A new approach to embryo cryopreservation. Theriogenology 1985; 27: 219.

45. RALL, W.F., Fahy. G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196C - by vitrification. Nature 1985; 313: 573 - 575.

46. RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by-vitrification. Cryobiol 1987; 24: (in press).

47. CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature 1959; 184: 466 -467.

48. BRACKETT, B.G. Applications of in vitro fertilization. In: Brackett, B.G., - Seidel, G.E.Jr., Seidel, S.M., eds. New technologies in animal breeding. New York: Academic Press, 1981: 141 - 161.

49. STEPTOE, P.C., Edwards, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. 1978. Lancet 2 : 366.

50. BRACKETT, B.G. A review of bovine fertilization in vitro. 1983. Theriogenology, 19: 1.

51. WHRIGHT, R.W., Jr. and BONDIOLI, K.R. Aspects in vitro fertilization and -- embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci. 1981; 53 : 702.

52. BRACKETT, B.G., D. BOICE, M.L., DONAWICK, W.I., EVANS, J.F., DRESSEL, MA.-- Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol.-- Reprod. 1981; 27; 147.

53. IRITANI, A. IVF by routine method and by micromanipulation. Fertil. Steril. Program Suppl. 5th World Congress on IVF and ET, 1987: 21.

54. BRACKETT, B.G., BOUSQUET, D.; BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F.,DRESEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the - cow. Biol. Reprod. 1982; 27 : 147-158.

55. BEDOYA, M. Pregancies after in vitro fertilization of cow follicular cocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus.
J. Reprod. Fertil. 1985; 75: 551-556.

56. MABERT, R.D., SIRARD, M.A., BERNARD, C., BELAND, R., RIOUX, J.E., LECLERC, P., MENARD, D.P. BEDOYA, M. in vitro fertilization of bovine oocytes - matured in vivo and collected and laparoscopy. Therigenology 1986; 25 117-134.

57. XU, K.P., GREVE, T. COLLESEN, H. and HYTTEL, P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 1987; 81: 501.

58. CHENG, W.T.K., MOOR, R.M., POLGE, C. In vitro fertilization of pig and --- sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology 1986; 25 : - 146.

59. SINGH, E. Sexing of ca cattle embryos by chromosomal analysis. In: Greve T, ed Proceedings of the Symposium on the application of egg and embryos. Technologies to domestic animals. Copenhagen. Royal Veterinary and Agriculture University, 198: 19-20.

60. KING, W.A. Sexing embryos by cytological methods, Theriogenology 1984; 21:- 7-17.

61. PICARD, L. KING, W.A., BETTERIDGE, K.L. Production of sexed calves from frozenthawed embryos. Vet. Rec. 1985; 117: 603-608.

62. WHITE, K.L., LINDER, G.M., ANDERSON, G.B. and BON DURANT, R.H. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y on preimplantation mouse embryos. Theriogenology 1983; 19: 701.

63. WACHEL, S.S., H-Y antigen in the study of sex determination and control of - sex ratio. Theriogenology 1984; 21: 18-28.

64. ANDERSON, G.B. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. Theriogenology 1987; 27: 91-97.

65. WILLIAMS, T.J. A. technique for sexing mouse embryos by visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. Theriogenology 1986; 25 : 733 - 739.

65. MULLEN, R.J., Whitten, W.K., and Carter, S.C. En Annual report of the Jackson Laboratory. 1970. Jackson Lab. Bar Harbor, ME. p. 67.

66. WILLADSEN, S.M. and Fehilly, C.B. The development potencial and regulatory-capacity of blastomere from - 4 and 8 cell sheep embryos. En Fertilization of the human egg in vitro. Biolgical basis and clinical applica---tions.

67. WILLADSEN, S.M. Micromanipulation of embryos of the large domestic species. En Mammalian egg transfer. Ed. Adams, C.E. Boca Ratón, El CRC Preas p:-185. Edit. Beier, H.M. and Lindner, H.R. Springer Verlag, Berlin, 1983; p 353.

68. MOUSTAFA, L.A. and Hahn, J. Experimentalle Erzeugung von identischen Mausez willingen Dtsch. Tierarztl. Wsch. 1978; 85: 242.

69. OZIL, J.P., HEYMAN, Y. and Renard, J.P. Production of monozygotic twins by-micromanipulation and cervical transfer in the cow. Vet. Rec. 1982; 110; 126.

70. WILLIAMS, T.J. and SEIDEL, G.E. Jr. Methodology and equipment for microsurgery with mammalian ova. En Proc. Workshop IX Ann. Mtg. Int. Embryo ---Transfer Soc. 1983; p. 33.

71. SEIDEL, G.E. Jr. Cloning mammals by microsurgery to embryos. Second Sympo--sium on Advanced Topics in Animal Reproduction. Jaboticabal. Sp. Brasil, 1983; 141.

72. WILLIAMS, T.J., Eldsen, R.P. and Seidel, G.E. Jr. Pregnancy with bisected--bovine embryos. Theriogenology 1984; 22 : 521.

73. ILLMENSEE, K. and Hoppe, P.C. Nuclear transplantation in Mus musculus: Deve lopmental potencial of nuclei from preimplantation, embryos. 1983. cell 23:9.

74. HOPPE, P.C. and Illmensee, K. Microsurgically produced homozygous diploid - uniparental mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 1977; 74: 5637.

75. SEIDEL, G.E. Jr. Application of microsurgery to mammalian embryos. Therio--genology 1982; 17 : 23.

76. BREM, G., Tenhumberg, H., Kruff, B., Krausslich, H. Production of cattle --chimerae through embryo microsugery. Theriogenology 1985; 23 : 182.

77. SUMMERS, P.M., Shelton, J.N., Bell, K. Synthesis of primary Bos Taurus-Bos-indicus chimaeric calves. Animal Reprod. Sci. 1983; 6 : 91 - 102.

78. BUTLER, J.E., Anderson, G.B. Bon Durant, R. H. Production of ovine chimeras. Theriogenology 1985; 23 : 183.

79. SEIDEL, G.E. Jr. Mammalian oocytes and preimplantation embryos as methodological components, Biol. Reprod. 1983; 28: 36 - 49.

80. FEHILLY, C.B., Willadsen, S.M., Tucker, E.M. Interspecific chimaerism bet---ween sheep and goat. Nature 1984; 307: 634 - 636.

81. WAGNER, T.E., Hoppe, P.C., Jollock, J.D. , Scholl, D.R., Hodinka, R.L., ----- Gault, J.B. Microinjection of a rabbit beta-globulin gene into zygotes-and its subsequent expression in adult mice and their offsprin.,Proc.--Natl. Acad. Sci. 1981; 78: 6376 - 6380.

82. PALMISTERD. R.D., Brister, R.L. Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Resenfeld, M. G, Birnberg, N.C. and Evans, R.M. 1982. Dramatic growth of mice that develop fromm eggs microinjected with metalltionein-growth hormone fusions genes. Nature 300: 611.-

83. HAMMER, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E. Wall, R.J., Bolt, D.J. Ebert, K.M., Palmiter, R.O., Brinster, R.L. Production of transgenic rabbits, sheep - and pigs by microinjection. Nature 1985; 315: 680-683.

84. REXROAD, C.E., Wall, R.J Development of one-cell fertilized sheep ova following microinjection into pronuclei. Theriogenology 1987; 27: 611 - 620.-

85. LAND, R.B., Wilmut, I. Gene transfer and animal breeding. Theriogenology 1987; 27: 169 - 179.

Cuadro N° 1 : TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA PRODUCIR SUPEROVULACION

Día del Ciclo	Hora	FSH-P 28 mg	FSH-P 50 mg	PMS-G 2.000 U.I.
9	am	-	-	-
	pm	-	-	-
10	am	5.0 mg	2.5 mg	2.000 UI
	pm	5.0 mg	2.5 mg	-
11	am	4.0 mg	5.0 mg	-
	pm	4.0 mg	5.0 mg	-
12	am	3.0mg+PGF_2*	7.5 mg	PGF_2*
	pm	3.0 mg	7.5 mg	-
13	am	2.0 mg	5.0mg+PGF_2*	-
	pm	2.0 mg	5.0 mg	-
14	am	-	1.5 mg	-
	pm	I.A.	1.5 mg	I.A.
15	am	I.A.	-	I.A.
	pm	-	I.A.	-
16	am		I.A.	
	pm			
17	am			
	pm			

El cuadro indica tres tratamientos de superovulación tomando en este caso, el día 10 del ciclo estral como inicio del tratamiento.

Cuadro N°2 :

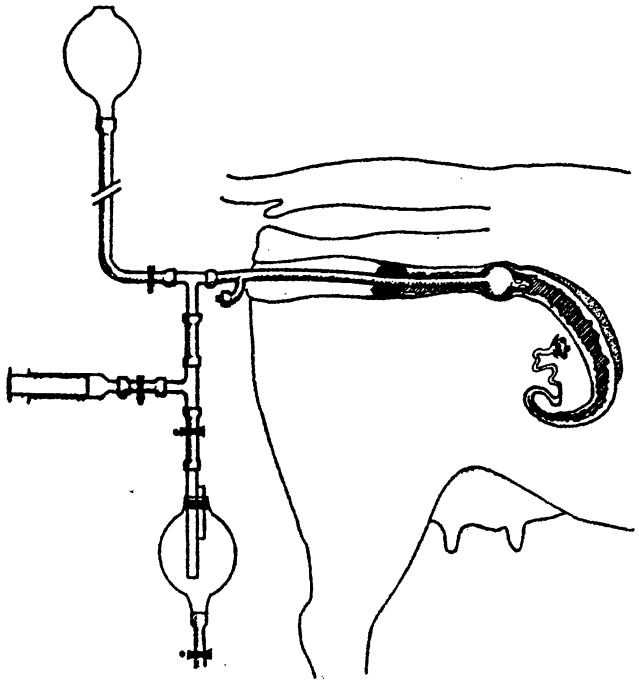
Día	Procedimiento
0	Colocación de implante + 1 ml Inyección*
7	FSH
8	FSH
9	FSH + PGF + extracción del implante
10	FSH
11	Estro + IA
12	IA
18	Colección de embriones

* 1 ml es equivalente a 3 mg de norgestomet y 5 mg de valerato de estradiol

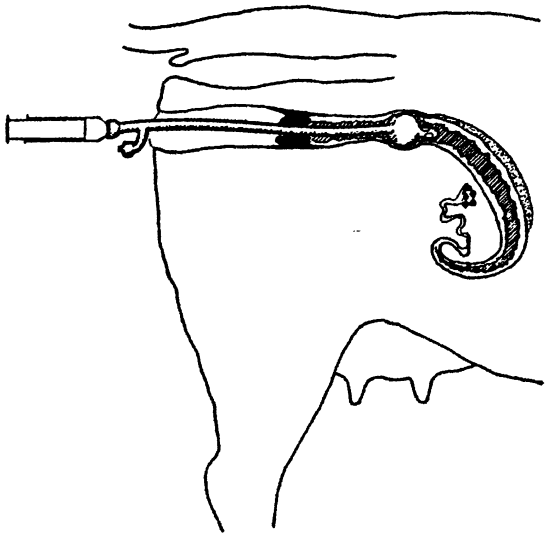
Cuadro N°3 : COMPOSICION DEL MEDIO DULBECCO'S FOSFATO BUFFER SALINO (PBS) PARA COLECCION Y MANTENCION DE EMBRIONES.

Substancia	Colección	Mantención
NaCl	8.oo gr/lt	8.00 gr/lt
KCl	0.20 gr/lt	0.20 gr/lt
CaCl	0.10 gr/lt	0.10 gr/lt
$MgCl_2 6H_2O$	0.10 gr/lt	0.10 gr/lt
$Na_2HPO_4 2H_2O$	1.15 gr/lt	1.15 gr/lt
KH_2PO_4	0.20 gr/lt	0.20 gr/lt
Penicilina	100 UI ml	100 UI ml
Estreptomicina	100 ug ml	100 ug ml
Fungizone	25 ug ml	25 ug ml
Suero Fetal	1 - 2 %	10 - 20 %
Piruvato		0.33 mM
Glucosa		1 mg/ml

CUADRO N° 4



Método de recuperación por gravedad. Los cuernos se lavan llenando el lumen con medio de cultivo.



Método de recuperación por aspiración interrumpida. Se lavan los cuernos con pequeñas cantidades de medio de cultivo (20-60 ml).