

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

Dr. Hans Andresen *

INTRODUCCION

Han pasado casi 100 años desde que se hizo la primera transferencia de embriones en conejos. Constituyó en aquella época un acontecimiento importante en el desarrollo del conocimiento biológico y de la fisiología de la reproducción.-

Hoy en día la transferencia de embriones en las especies productivas es una técnica comercial de gran valor económico para la producción pecuaria. Es posible que en un futuro no muy lejano adquiera la misma importancia que actualmente tiene para la ganadería la inseminación artificial. Esto ocurrirá una vez que se hayan resuelto diversos problemas técnicos que por el momento impiden su aplicación masiva.

Pero permítame plantear una reflexión sobre los alcances del método en nuestro medio.

En cierto modo la transferencia de embriones es el equivalente a los vue los ultrasónicos; que pueden ser muy útiles en países desarrollados, pero inaccesibles o inaplicables en países atrasados.-

La mayoría de los países latinoamericanos son países de contraste donde se conjuga el transporte pedestre o a lomo de bestia con el transporte ultrasónico; donde las formas más primitivas de producción subsisten con las de la más alta tecnología. Por lo general estos contrastes marchan paralelos a los contrastes socio-económicos característicos del tercer mundo. Lo que significa que si se dan las condiciones de cambio socio-económicos que favorezcan su desarrollo, estos países pueden expandir aceleradamente la alta tecnología y aplicarla a todos los niveles del ámbito nacional.-

Con respecto al Uruguay, se plantea - a nuestro juicio - una situación peculiar. No es un país de contrastes; posee a nivel nacional, un desarrollo socio-económico mas o menos uniforme y un alto nivel cultural, educativo y sanitario (si exceptuamos la hidatidosis). Lo que no encaja dentro de este

* Profesor Principal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
Coordinador de CIBA-GEIGY, Lima - Perú.

esquema- y es lo que llamaríamos la paradoja uruguaya - es su estructura agropecuaria, conservadoramente estática. A pesar de una ganadería de alta calidad genética, no se ha resuelto el problema de la alimentación ni se ha generalizado la inseminación artificial; medidas ambas indispensables para el desarrollo ganadero del Uruguay y que merecen la atención prioritaria de los médicos veterinarios.

Hablar entonces de transferencia en embriones parecería peregrino y quijotesco. Pues bien, por un lado somos algo quijotes y por otro lado tenemos confianza en la capacidad de nuestro gremio de empujar el carro del progreso a pesar de las adversidades.

OBJETIVOS Y TECNICAS

Para que tenga justificación, la transferencia de embriones debe llegar a convertirse en una técnica de aplicación universal, como la inseminación artificial. En consecuencia, debemos concentrar todos nuestros esfuerzos en perfeccionar las técnicas no quirúrgicas de recuperación y transferencia de embriones. Los resultados obtenidos con estas técnicas son aún poco satisfactorios desde el punto de vista comercial. Los principales problemas que están por resolver actualmente son los siguientes:

1. Superovulación y recuperación de embriones

Ambas son todavía demasiado erráticas. El problema de superovulación deberá resolverse ya sea mediante la producción de hormonas folículo-estimulantes de superior calidad o, mejor aún, perfeccionando la técnica de producción in vitro de embriones en serie mediante la separación de blastómeros en embriones de 4 a 8 células.

La recuperación de embriones depende en gran medida de la habilidad y experiencia del técnico y del equipo de recuperación que se use. Este sin duda podrá perfeccionarse en el futuro.

2. Sincronización de vacas receptoras.

Actualmente poco satisfactorio.

3. Transferencia vía cervical sin rechazo de los embriones.

Este es posiblemente uno de los problemas más serios que debe resolverse.

El manipuleo del cuello del útero estimula un mecanismo de expulsión del embrión transferido que es particularmente sensible durante los primeros 6 días después de la ovulación.

4. Conservación mediante el congelamiento de embriones

Simultáneamente con el perfeccionamiento de estos aspectos técnicos será también posible - en el futuro - determinar el sexo de los embriones antes de transferirlos.

Comentaremos brevemente las ventajas que nos ofrece la transferencia de embriones en la producción ganadera:

1. Mejoramiento genético acelerado. Este aspecto es de menor importancia para nosotros, ya que por un lado todavía podemos obtener un progreso genético rápido y bueno mediante la inseminación artificial aprovechando la amplia disponibilidad mundial de toros probados a un costo razonable; y por otro lado porque todavía debemos mejorar mucho el medio ambiente (alimentación y manejo) a fin de que el superior potencial genético tenga posibilidades de expresarse en mayor producción y mejor productividad.
2. Mejor eficiencia reproductiva. Una vez que se logre superar completamente el problema del rechazo por transferencia transcervical, es de esperar una mejor tasa de fertilidad basada en la transferencia de embriones viables por selección natural, toda vez que sabemos que uno de los problemas más importantes de infertilidad es la muerte de embriones débiles.
3. Transferencia de embriones sexados. Estamos más cerca de la selección de sexos en las crías por este método, que mediante la segregación de espermatozoides machos y hembras, que hasta la fecha no ha ofrecido resultados a pesar de varias décadas de investigación.
4. La obtención de mellizos, especialmente para las razas de carne.

A continuación presentamos una sinopsis de la técnica y el material empleado para nuestro trabajo, según los lineamientos descritos por el Prof. Dr. Joachim Hahn, de Hannover (Alemania).

BIBLIOGRAFIA

- BRENT, P. (1978). - The New Frontier - Bovine and Equine Embryo Transfer.
RIO VISTA FARMS Texas, (Pg. 158-164).
- FAHNING, ML (1978). - Ova Transfer in Cattle. OVA TECH' INC.
Wisconsin, (pg. 151-157).
- HAHN, J. (1978) . - Die unblutige Eigewinnung beim Rind unter Berücksichtigung der Vorbereitung der Spendetiere und der Entwicklung der Eizellen in Eileiter und Gebärmutter. DTW 85:133-152.
- Inf. Serv. Agr. Canadá (1979). - Embryo Transfer in Farm Animals (1977) Monograph 16.

RECUPERACION Y TRANSFERENCIA NO-QUIRURGICASA. SUPEROVULACION

La vaca donante debe estar entre el día 5 y 16 del ciclo estrual para recibir uno de los dos siguientes esquemas de tratamiento:

- a) Inyectar 2000 UI PMS (1500 a 3000 según tamaño); como Gestyl (Organon) o Anteron (Schering); IM.
A las 48 horas inyectar 0.5 mg. de Estrumate (ICI) o 20 mg. Prostin (Upjohn); IM.
Esperar el celo a los 4 días de haber inyectado el PMS.
- b) En vez de PMS, usar 25 - 50 UI de FSH de origen hipofisiario (FSH-P de Burns); IM o SC.
Se administra 5 UI de FSH cada 12 horas (por ejemplo a las 7 am y 7 pm) hasta que se presente el celo o hasta completar los 50 UI de FSH.
A las 48 horas de haber iniciado el tratamiento con FSH; inyectar prostaglandina en la dosis indicada.
Esperar el celo entre 3 y 5 días de haber iniciado el tratamiento con FSH.

B. INSEMINACION

Es de esperar el celo a partir del día 19 1/2 del ciclo tratado (3 1/2 días después del primer tratamiento hormonal). En la mayoría de los casos el celo se observa el día 20 y tiene 24 horas de duración. Se realizan 3 inseminaciones con 12 horas de intervalo, la primera 12 horas después de iniciado el celo.
El día de la presentación del celo es denominado D O.

C. RECUPERACION DE BLASTOCISTOS

En vacas todos los embriones se encuentran en el útero 5 días después del inicio del celo.

En vaquillonas el pasaje demora unos días más. Un pequeño porcentaje de embriones suelen encontrarse aún en los oviductos al 7º y 8º día de iniciado el celo. Siete días después de iniciado el celo (D 7) los embriones se encuentran en la fase inicial de formación del blastocisto que se reconoce por la cavitación que se forma.

La operación de recuperación se realiza el día D 7 utilizando un cateter N°18 modelo Neustadt/Aisch.

Este cateter se introduce hasta el punto de ubicar la porción inflable a la altura de la bifurcación externa de los cuernos (ligamento intercornual).

Se fija el cateter a la mucosa del cuerno inflando el manguito con una jeringa con máximo 10 ml. de aire para vaquillonas y 15 ml. de aire para vacas.

El lavado se realiza con el medio PBS enriquecido (ver Anexo N°1).

El mismo medio se utiliza para la conservación de los embriones, pero con mayor contenido de suero fetal (medio del trasplante).

Con una jeringa de 50 ml. se introduce en el cuerno de 25 a 50 ml. de líquido entibiado al Baño María.

Bajo suave masaje rectal se recupera el líquido con la misma jeringa. Esta operación se repite hasta 10 veces en el mismo cuerno.

El líquido recuperado se va depositando en envases de vidrio de 1.00 ml. que se mantienen en Baño María a 37°C.

Conviene identificar claramente todas las fracciones para determinar el porcentaje de recuperación de embriones por cada lavado.

Después de 20 minutos se decantan 90 ml. de cada frasco usando un tubo plástico a modo de sifón. Los 10 ml. del fondo que deben contener la mayoría de los embriones, se colocan en una placa Petri o luna de reloj y se examinan con un estereomicroscopio de disección a 10 y 40 aumentos. El resto del líquido se revisa igualmente para evitar algunas pérdidas de embriones. El examen tiene por objeto no solo identificar los embriones sino también seleccionar aquellos normales. Se estima que un 25% se rechazan por ser embriones en vías de degeneración o por ser óvulos no fecundados.

El lavado y examen se repite en el otro cuerno.

Los blastocistos seleccionados son colocados en un medio de transporte a razón de 1 ml. por blastocisto. Una vez recuperados todos los blastocistos útiles, se procede a colocarlos en recipientes in-

dividuales de máximo 3 ml.. Ideal es aislar los embriones en pajuelas o pipetas cassou (0.3 ml. por embrión). Estas pipetas perfectamente selladas y aisladas se mantienen en Baño María a 37°C (termo) y se transportan para su trasplante inmediato usando un cateter apropiado.

* * *

ANEXO N°1A. MEDIO DE LAVADO - PBS1. Equipo

1 fco. volumétrico o matraz de 1000 ml.
1 tubo PBS "A"
1 tubo PBS "B"
10 ml. de suero de feto bovino
Glucosa
Piruvato de sodio
Antibióticos
Agua tridestilada

2. Preparación

Llenar el fco. con 50 ml. de agua tridestilada. Agregar 1 tubo PBS "A".
Agitar hasta disolver completamente.
Agregar un tubo PBS "B" . Agitar hasta disolver completamente
En balanza de precisión pesar:

1000 mg. glucosa
36 mg. piruvato de sodio
20 mg. penicilina (50,000 unidades)
40 mg. estreptomycinina

Transferir este material al fco. y mezclar bien.
Llenar el fco. con agua tridestilada hasta la marca.
Esterilizar mediante filtración.
Este medio puede conservarse en refrigeración hasta 4 semanas (5°C)
Agregar 10 ml. de suero fetal bovino inactivo, sólo poco antes de usar (1%).

B. MEDIO DE PRESERVACION - PBS

A 90 ml. de la solución para lavado agregar 10 ml. de suero fetal bovino (10%). Ajustar el pH a 7.2 y esterilizar mediante filtración.

C. COMPOSICION DEL MEDIO - PBS

Modificado según R. Dulbecco (J.Exp.Med. 1954:99,167)

<u>Compos Tubo A</u>	<u>mg/1</u>	<u>Compos. Tubo B</u>	<u>mg/1</u>
ClNa	8000.0	Na ₂ H PO ₄	1000.0
ClK	200.0	NaH ₂ PO ₄	150.0
Cl ₂ Kg.6H ₂ O	100.0	KH ₂ PO ₄	200.0
Cl ₂ Ca anhídrido	100.0		

Indicaciones de dilución y esterilización

Es recomendable diluir cada tubo por separado en 450 ml. de agua tridestilada. Se mezclan luego y se esteriliza la solución final mediante filtración. También se puede esterilizar en autoclave. En este caso cada solución se esteriliza por separado; se enfrían y luego se mezclan. Completar la solución a 1000 ml.

* * *

ANEXO N°2A. SILICONIZADO

1. Todo el material de vidrio limpio es tratado por la tarde con un preparado a base de silicona.
Se deja escurrir durante la noche.
Luego se seca al horno a 200°C por 6 horas.
2. Los cateteres de goma, antes de usarse, son tratados con un spray quirúrgico a base de silicona.
3. Preparado a base de silicona:
 - 100 ml. de Cloroformo
 - 2 ml. de aceite de silicona de viscosidad ± 350.
 mezclar bien.

B. MATERIAL

1. Gonadotropinas
FSH (F.S.H. de Burns-Biotic, precio US 7.) 50 mg. por vaca o
3000 U I " "
2. Material químico
Medios BPS (ver anexo 1)
Líquido siliconizador (ver anexo 2,A)
3. Cateter Neustadt/Aisch N° 18
4. Material sintético
1 jeringa de 20 ml.
2 jeringas de 50 ml.
10 tubos de polietileno de 30 cm. de largo y 3 mm. de diámetro interior.
50 viales de 3 ml. o
50 pajuelas Cassou de 0.3 ml.
10 fcos. aislantes para transportar viales o pajuelas.
1 microsuccionador.
5. Material de vidrio
2 fcos. volumétricos de 1 litro c/u.
10 fcos. de vidrio de 500 ml. c/u.
10 fcos. de vidrio de 100 ml. c/u.
6 placas Pttri
2 lunas de reloj
100 pipetas capilares de 20 microlitros (B-D)
4 pipetas de 10 ml.
6. Otro material.
Estereomicroscopio de disección con luz incorporada: 10 y 40 aumentos.
Placa temperada.
1 termo boca ancha.
1 tina de Baño María.
Equipo de inseminación Cassou
Papel aluminio para tapar los fcos.
Papel de filtro
Algodón.

* * *