

CAPÍTULO XXV

PROCEDIMIENTOS EN LOS PROGRAMAS DE TRANSPLANTE DE EMBRIONES EN GANADO BOVINO

- I. INTRODUCCIÓN
- II. VENTAJAS DEL TRANSPLANTE DE EMBRIONES
- III. SELECCIÓN DE DONADORAS
- IV. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE LA DONADORA
- V. TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO DE LA DONADORA
- VI. RECOLECCIÓN NO QUIRÚRGICA DE EMBRIONES
- VII. PROCEDIMIENTOS PARA LA BÚSQUEDA DE LOS EMBRIONES
- VIII. MANEJO Y CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES
 1. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES
 2. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA
- IX. MEDIOS PARA RECOLECCIÓN, MANEJO Y MANTENIMIENTO DE EMBRIONES
- X. MONTAJE DEL EMBRIÓN PARA EL TRANSPLANTE DIRECTO
- XI. TRANSPLANTE DEL EMBRIÓN PROPIAMENTE DICHO
- XII. LECTURAS RECOMENDADAS

I. INTRODUCCIÓN

En la última década, la reproducción en ganado bovino ha evolucionado de manera acelerada, marcando el inicio de una nueva etapa. Esta se caracteriza por el desarrollo de una serie de técnicas que contribuyen a aumentar, en forma rápida, la capacidad reproductiva y de mejoramiento genético del ganado bovino. En esta especie, las técnicas para la manipulación del proceso reproductivo que han recibido mayor atención y desarrollo en los últimos cinco años han sido la ovulación múltiple y transferencia embrionaria, congelación de embriones, producción de gemelos, producción de embriones *in vitro*, multiplicación de embriones, biseción o transferencia nuclear, sexado de embriones, sexado de fetos, transferencia de genes.

La mayoría de estas técnicas se llevan a cabo en forma comercial en ganado bovino, con excepción de la transferencia de genes, aún en etapa experimental. La importancia de estas nuevas tecnologías está en la forma en que se puedan complementar unas con otras y en la posibilidad de que sean usadas comercialmente.

Estas nuevas tecnologías, junto con la inseminación artificial (IA) y un programa selectivo de cruzamientos, se pueden convertir en parte de un sistema genéticamente superiores. Muchos de estos avances tienen y tendrán un gran impacto en la producción de ganado bovino en todo el mundo. Es importante que el agrotécnico y el criador progresista conozcan los aspectos más importantes y prácticos de dichas técnicas.

II. VENTAJAS DEL TRANSPLANTE DE EMBRIONES

El transplante de embriones (TE) también conocido como transferencia embrionaria, consiste en el proceso de colección de embriones de una madre biológica o genética (llamada donadora) y la colocación de los mismos en el útero de madres adoptivas (llamadas receptoras), en las que se lleva a término la gestación. Dicha técnica consta de cuatro fases principales: 1) Ovulación múltiples o superovulación, 2) Fertilización de los óvulos, 3) Colección de los embriones y 4) Transferencia ó congelación de los embriones. Cada una de estas fases consta de varios procedimientos, que aunque no todos se consideran en este artículo, deben ser llevados a cabo de modo eficiente para obtener resultados exitosos.

Existen muchas aplicaciones de la transferencia embrionaria en ganado bovino; entre las más corrientes están: 1) Aumentar la cantidad de crías que puedan obtenerse de hembras genéticamente superiores, 2) Propagar donadoras que físicamente no puedan reproducirse, 3) Optimizar el uso de semen de gran valor, 4) Transportar material genético con facilidad a través de grandes distancias y fronteras, 5) Ayudar en la aclimatación de ciertas razas a diversos ambientes, 6) Desarrollar un hato de manera rápida, 7) Controlar la transmisión de enfermedades, 8) Facilitar la comercialización de material genético, 9) Diagnosticar fallas reproductivas en vacas donadoras, y 10) Auxiliar en pruebas de pro genie.

A pesar de todos los beneficios que ofrece la TE, también hay algunas desventajas que limitan el uso de esta técnica, como son las siguientes: 1) Es relativa-

mente de baja eficiencia, 2) Requiere tiempo, 3) Las donadoras y receptoras deben ser animales sanos desde el punto de vista reproductivo, 4) Las donadoras deben ser de calidad superior ya que el TE por si mismo no mejora la calidad genética, y 5) Puede crear una saturación del mercado y por lo tanto disminuir los precios del ganado genéticamente superior.

Los resultados que se pueden obtener de un programa de transferencia embrionaria en ganado varían grandemente en función de las vacas donadoras, empresas y técnicos. Los factores relacionados con el éxito de un programa de transferencia de embriones para la obtención de buenos porcentajes de preñez dependen de: 1) La calidad y el estado de desarrollo de los embriones, 2) El manejo y el cuidado de las donadoras y receptoras, 3) La adecuada sincronización entre donadoras y receptoras, y 4) La habilidad técnica de la persona que transplanta embriones.

En general, la proporción de vacas receptoras que tienen partos de TE es muy similar o ligeramente superior a la de vacas que tienen partos después de una sola inseminación. Esta técnica está disponible en forma comercial prácticamente en todo el mundo, pero existe una gran variación en los precios y en la forma en que están estructurados.

La aplicación de la transferencia embrionaria como auxiliar en pruebas de progenie debe considerarse en forma separada y especial. La contribución potencial de TE a los programas de mejoramiento genético de las razas de ganado, cuando se emplea como un método auxiliar en pruebas de progenie, ha sido enfatizada por la reciente adopción de sistemas de Ovulación Múltiples y Trasferencia Embrionaria (OMTE, por sus siglas en español; MOET, por sus siglas en inglés), en varios países.

III. SELECCIÓN DE DONADORAS

La selección de vacas donadoras puede estar basada en dos criterios principales: 1) Selección del potencial genético en base a la producción de leche o carne, y 2) La selección de animales con una eficiente capacidad reproductiva. El elemento más importante que priva en la selección de una vaca donadora es el mejoramiento genético y consecuentemente un mayor valor de mercado de las crías. Los índices de una vaca, los cuales son la medida de la habilidad de una madre para transmitir la capacidad de aumentar o disminuir la producción de carne o de leche a su descendencia pueden perfectamente ser registrados. Igualmente las ganancias de pesos de las crías pueden ser usadas para la selección de madres superiores en la producción de carne. Desafortunadamente esos parámetros son frecuentemente ignorados, resultando las crías de variables méritos desde el punto de vista genético.

Es responsabilidad de los veterinarios determinar las características reproductivas de una vaca donadora, esto tiene una gran importancia ya que vacas subfértiles ó con problemas, tienden a disminuir el número de óvulos, las tasas de fertilización y los embriones recuperados. Es posible observar en estas vacas una alta incidencia de lavados en los cuales no se recuperan ni óvulos ni embriones,

siendo la superovulación poco rentable, ya que por lo general el pago está determinado por cada preñez obtenida.

En primer lugar, la historia reproductiva de las donadoras en forma individual y luego a nivel del rebaño deberá ser determinada y cuidadosamente examinada. La donadora ideal podría tener un parto anual, un post-parto normal y una historia de uno a dos servicios por cada concepción y por lo menos dos partos normales. Las alteraciones reproductivas que afectan a una donadora son muy numerosas, pero podemos señalar las más frecuentes: ciclos estruales irregulares, sub-estro, degeneración quística de los ovarios, prolongados intervalos entre partos, problemas de tipo nutricional, patologías útero-ováricas, abortos, servicios repetidos, ovulación retardada, enfermedades venéreas, problemas de tipo endocrino, distocias y altos niveles de producción láctea.

El segundo paso es la evaluación de las características del tracto reproductivo de la vaca donadora. El animal ideal podría tener cervix y cuernos uterinos con un rango de 25-40 mm de diámetro dependiendo de la edad, raza, partos anteriores, etc. Una gran diferencia en el tamaño de los cuernos nos podría sugerir un problema de endometritis o fallas en la involución uterina.

La palpación de los ovarios podría estar asociada con las observaciones que el propietario hiciera en cuanto a la ciclicidad de las vacas y los datos reproductivos anteriores. Además los ovarios deberán estar libres de adherencias a nivel de las bursas ováricas, ya que esto afecta drásticamente la recolección de los embriones. Finalmente una inspección de la vagina con especulum, podría determinar cualquier defecto del cervix (cervix dobles, etc.) y generalmente nos puede indicar si el animal tiene endometritis o no. La determinación de la conformación y características del útero es importante ya que podría afectar la fertilidad. La selección del catéter para evitar posibles dificultades de manipulación del tracto genital debe ser evaluada antes de comenzar el trabajo superovulatorio.

Resulta de interés considerar la localización del tracto reproductivo. Cuando el cervix y los cuernos uterinos están ubicados predominantemente en el piso de la pelvis, es relativamente fácil su manipulación y aumenta el pasaje del catéter. Las donadoras con largos tractos genitales y que han tenido un elevado número de partos han sufrido cambios morfológicos dificultan la colocación del catéter y la manipulación del útero. Es importante considerar que las novillas presentan un problema común que es generalmente una estrechez del canal cervical necesitando catéteres más finos (12-14) que los utilizados en las vacas. Se ha determinado que alrededor de un 10% de las vacas mestizas lecheras cebú presentan problemas de estenosis y deformación del cervix.

Hembras con antecedentes de mastitis crónica, defectos podales y otras alteraciones físicas de tipo congénito y/o hereditario deben ser descartadas como vacas donadoras. Es de importancia recordar que todas las características deseables o indeseables de una hembra seleccionada como donadora serán multiplicadas a través de su descendencia. Igualmente las vacas donadoras deben mantener un balance energético positivo y exhibir una buena condición corporal.

Las donadoras deben estar libres de enfermedades tales como: Brucelosis, Tuberculosis Leptospirosis, Leucosis, Campilobacteriosis, Tricomoniiasis, IBR y DVB. Es esencial que las vacas seleccionadas como donadoras presenten actividad cíclica de forma regular durante el post-parto. En muchos países el grupo sanguíneo de la donadora es exigido previo al transplante para hacer efectiva la identificación de la cría en cuanto a su genotipo materno.

IV. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE LA DONADORA

Las donadoras son inseminadas 2 a 3 veces con intervalos de 10-12 horas, luego de detectado el celo. Es importante un control previo de la calidad del semen a utilizar. Comúnmente se emplean dos inseminaciones por donadoras. Cuando se trata de semen de alto costo se debe modular el uso del mismo en función de la intensidad del celo y desarrollo de la estructura folicular. Cuando el celo se adelanta 24 horas o más de la fecha prevista deberá emplearse semen más económico y preferiblemente una sola inseminación. Estos celos adelantados generalmente son el resultado de una falla en el proceso superovulatorio. Semen de dos o más toros y/o razas (inseminación heteróloga) es también utilizado, siendo necesario la tipificación sanguínea de los terneros al nacimiento. Se recomienda emplear técnicas higiénicas y fundas estériles durante el servicio. Si durante o después del servicio se observa un muco turbio o residuos purulentos, aplique penicilina y estreptomycin (5.000.000 UI y 2.500 mg respectivamente) intramuscular 24 horas después del último servicio.

V. TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO DE LA DONADORA

Un solo embrión o múltiples embriones pueden ser colectados de una ovulación natural o de una donadora superovulatoria respectivamente. Para una máxima eficiencia 2 a 4 donadoras podrían ser tratadas y sincronizadas con sus respectivas receptoras. Para cada tratamiento se recomienda un potencial de 6 a 8 receptoras por cada donadora.

La superovulación es el último paso en el proceso de producción de embriones. Ocurren amplias variaciones en las respuestas superovulatorias debido a la influencia de la edad, raza, lactación, estado nutricional, estación del año y fase del ciclo estrual en el cual se inicia el tratamiento. La hormona foliculo estimulante (FSH-P) o el suero de la yegua preñada (PMSG) pueden ser usadas. El corto tiempo de vida de la FSH hace necesario que se apliquen 2 inyecciones diarias por un periodo de 4 a 5 días. El tratamiento se inicia durante la mitad de la fase luteal (día 8 a 12) del ciclo de la donadora y se emplea la prostaglandina (PGF₂) para sincronizar el ciclo de las donadoras y receptoras.

Alternativamente, el tratamiento puede ser iniciado el día 16 ó 17 (día 0 = celo) del ciclo estrual natural de la donadora. Las dosis de FSH se aplican en una forma decreciente en niveles de 6, 5, 4, 3 y 2 mg dos veces diarias. En los Cuadros 1 y 2 se presentan dos ejemplos de regímenes superovulatorios con FSH. La prostaglandina es administrada rutinariamente (25-35 mg de PGF₂ o 500 mcg de su

análogo) al momento de la 5ta o 7ta inyección de FSH la cual es seguida por el celo y la ovulación. El intervalo entre la administración de PGF2 α y el inicio del estro es de 12 a 24 horas siendo más corto en animales superovulados que en aquellos que ovulan en forma espontánea, tanto en novillas como en vacas. Es por eso que las receptoras deberían ser inyectadas con PGF2 α 24 horas antes que las donadoras, cuando se utiliza este método previo de sincronización. Las respuestas a los regímenes exógenos de FSH alcanzan rangos desde 0 hasta múltiples ovulaciones con un promedio de 10 a 12. Aparentemente no hay diferencias en respuestas entre regímenes de 4 a 5 días. Las novillas requieren dosis menores que animales viejos. Cuando una donadora ha fallado en responder al tratamiento superovulatorio, un segundo intento en superovular, con igual cantidad de FSH, es posible que resulte también en un fracaso.

Cuadro 1
Tratamiento superovulatorio con PMSG

Día	Tratamiento I	Tratamiento II
0	25 mg PGF2 α	25 mg PGF2 α
3	Estro	Estro
13 am		2500 UI PMGS
14 am	2500 UI PMGS	
16 am	35 mgs PGF	35 mg PGF
Pm	20 mgs PGF	20 mg PGF
18	Estro IA 8 - 10 horas luego del inicio del estro repetir 18 - 24 h o servicio natural poner la donadora con el otro cada 8 horas por 10 minutos hasta que lo rechace	Estro IA 8 - 10 h luego de iniciado el celo, repetir a las 18 - 24 h o servicio natural por exposición de la donadora al toro cada 8 horas por 10 minutos hasta que lo rechace.

Cuadro 2
Tratamiento superovulatorio con hormona folículo estimulante (FSH-P)

Día	Dosis iguales / 4 Días	Dosis decrecientes / 5 Días
3 (6-14 ciclo)	25 mg PGF2 α	25 mg PGF2 α
0	CELO	CELO
1 (8-12 día)	5 mg FSH am y pm	6 mg FSH am y pm
2	5 mg FSH am y pm	5 mg FSH am y pm
3	5 mg FSH am y pm + Prostaglandina	4 mg FSH am y pm
4	5 mg FSH am y pm	3 mg FSH am y pm + Prostaglandina
5	CELO	2 mg FSH am y pm
6	I.A. 12 y 24 h	CELO - I.A. 12 y 24h

Tratamiento I = régimen de 4 días con dosis iguales de 5 mg c/u

Tratamiento II = régimen de 5 días con dosis decrecientes

Las inseminaciones se realizan 10-12 h (1era. I.A.) y 24 h (2da.I.A.) después del inicio del celo.

En ocasiones es difícil determinar en forma exacta el número de ovulaciones por medio de la palpación de los ovarios por vía rectal cuando se excede de 4-6 CL por ovario o cuando muchos folículos anovulatorios están presentes. Está demostrado que un excesivo número de folículos anovulatorios en presencia de cuerpos lúteos, influyen en forma adversa el porcentaje de embriones recuperados. Esto se atribuye a una desfavorable relación en los niveles estrógenos/progesterona, lo cual afecta el transporte tanto de gametos como de los embriones.

El suero de yegua preñada (PMSG) ha sido también usado para superovular vacas. Mientras la PMSG tiene la ventaja de requerir solo de una dosis, su promedio de vida es largo con niveles que pueden ser fácilmente medibles en sangre 10 a 15 días luego de la administración de 1500 a 3000 UI de PMSG, siendo importante la relación FSH/LH del momento de la gestación cuando el suero fue colectado. La PMSG es un producto crudo de difícil estandarización y por ser una proteína exógena de propiedades antigénicas puede estar reducida su respuesta luego de un uso repetido.

La PMSG puede ser inyectada SC o IM en el día 16 ó 17 del ciclo estrual normal. Las dosis van desde 1500 a 3000 UI, pero de 2000 a 2500 UI son más comúnmente usadas. Cuando se emplean en combinación con la prostaglandina, la PMSG administrada entre el día 8 al 15 del ciclo estrual debe ser seguida por la prostaglandina 48 a 72 horas después.

Un esquema de tratamiento se presenta en el Cuadro 3. La inyección de PMSG inicialmente favorece un efecto luteotrófico, que ha sido relacionado con la actividad de la hormona luteinizante. La LH presumiblemente es la responsable de las ovulaciones prematuras de folículos de gran tamaño presentes al momento de la inyección de PMSG.

Cuadro 3
Dosificación de folltropin en vacas brahman y mestizas
utilizado para la superovulación

DIA	AM (7:00)	PM (6:00)
1 (9-12) post celo	2.5 cc folltropin	2.5 cc folltropin
2°	2.0 cc folltropin	2.0 cc folltropin
3°	1.0 cc folltropin	2.0 cc folltropin 2.0 cc prosolvin
4°		1.0 cc folltropin detección celo
5°	detección celo e inseminación	detección celo e inseminación
12°	recolección de embriones	

* Prosolvin (Intervet), análogo de prostaglandina F2 α

La formación de CL precoces es la causa de la inhibición de posteriores ovulaciones. Estos CL no están suficientemente maduros como para sufrir la lisis por la PGF2 administrada dos días después de la PMSG. Ellos secretan suficiente

progesterona para bloquear la liberación de LH al momento que las donadoras superovuladas presentan el celo.

La administración de anti-PMSG (Neutra-PMSG, Intervet, Inc) 10-18 h después de iniciado el celo (primera inseminación) produce beneficios significativos sobre la respuesta superovulatoria, permitiendo el uso repetido de PMGS sin efecto detrimental de la fertilidad.

La PMSG provoca una continua estimulación de folículos debido a su larga vida media (primera instancia vida promedio 36 h, y una segunda instancia con vida media de 370 h). Por ello es necesario aplicar a las donadoras las hormonas liberadoras de gonadotropina LH al inicio del estro con el fin de precipitar las ovulaciones. No se encuentran beneficios en el proceso cuando se inyecta una dosis de estradiol (500 mcg) con el fin de anticipar el inicio del estro e intensificar su expresión.

Además de los extractos de hipófisis anterior de cerdo (FSH-P, CEVA-Sanofi, USA.), ovina (Ovagen, Immunochemical Product, New-Zeland) y equina (FSH-E), recientemente ha sido sintetizada una gonadotropina FSH de origen vacuno (Superoova), al igual que una FSH-P de bajo contenido de LH (Folítropin, Vetrepharm, Canadá), la cual ha demostrado ser efectiva mediante una sola inyección subcutánea (SC) detrás de la paleta, seguida 48 horas después de una dosis de PGF2 . Además de las vías I.M. y SC de administración también ha sido ensayada recientemente la inyección epidural con el fin de inducir superovulación.

La gonadotropina de la orina de la mujer menopáusica (HMG, Pergovet, Serrone, Italia), ha sido satisfactoriamente utilizada en la superovulación de bovinos. El costo mayor respecto a los productos de origen animal, ha limitado su utilización comercial.

VI. RECOLECCIÓN NO QUIRÚRGICA DE EMBRIONES

Los embriones bovinos tienden a descender hasta el útero alrededor del día 4-5 (estro=día 0) y salir de su zona pelúcida entre los días 8 a 10. Consecuentemente, la mayoría de las recolecciones no quirúrgicas deberán hacerse entre los días 6 a 8 (Cuadro 4). Los embriones bovinos pueden ser recolectados no quirúrgicamente con diferentes modelos de catéteres, como el catéter de Foley, Rush Cateter, IMV cateter, y el catéter Rugofer. Las Sondas de Foley de dos vías (Francesa tamaños N° 16 a 24) con un balón inflable de 5 ml son usadas normalmente; el catéter de dos vías posee un canal para inflar el balón más un canal simple para la entrada y salida del medio de lavado. Un estilete estéril (como el usado en la pistola de I.A.) se inserta a todo lo largo de la sonda con el fin de tornarla lo suficientemente rígida, para ser introducida en el útero, guiándola con la mano a través del recto. La donadora debe trabajarse en un brete; a animales nerviosos se les puede aplicar de 5 a 10 mg de clorpromazina o xilazina (0,1 mg/kg). Las heces son cuidadosamente removidas para evitar la aspiración de aire. Se efectúa entonces un estimado previo del número de ovulaciones (CL).

La anestesia epidural (Lidocaina 2%, de 4 a 6ml) se aplica con el objeto de prevenir la defecación y las contracciones. La vulva y la región perineal son cuidadosamente lavadas y la cola protegida. Si el cervix es fino y tortuoso, se puede usar un dilatador cervical a fin de expandirlo. Tanto el dilatador como la sonda son protegidos con una funda de plástico tipo higiénico y descartable antes de ser introducidos en la vagina. Este protector es perforado justo antes de que el instrumento entre en el os-cervix. El dilatador rígido debe ser usado con extremo cuidado, ya que puede perforar las paredes del útero, cuando es forzado a pasar a través del canal cervical. Los labios de la vulva son separados y la sonda de Foley con el estilete son insertados en el interior de la vagina hasta el lumen del cervix el cual atraviesan. Una vez dentro del útero se insufla el balón en la base del cuerno correspondiente. El balón es suavemente insuflado con 15 a 25 ml de aire en animales adultos y 10 a 15 ml en el caso de novillas. El endometrio puede ser fácilmente lacerado por sobredistensión, resultando en hemorragias y escape o salida de la solución del lavado hacia el mesometrio desde el cual no puede ser recuperado.

Luego que el catéter está en la posición correcta, se retira el estilete y el catéter es conectado a un tubo Y utilizando un conducto de goma estéril unido a una botella con 1000 ml de solución de lavado. La entrada y salida de líquido es controlada mediante el uso de pinzas; mientras la salida del tubo es ocluida, la solución de lavado entra al útero por gravedad al estar la botella suspendida a un metro sobre el nivel del útero. El fluido es recogido directamente en el filtro para embriones (75 mm). Alternativamente cuando los filtros no están disponibles, el líquido puede ser recolectado en un cilindro graduado. Los embriones se dejan decantar por unos 20 a 30 minutos; el sobrenadante es cuidadosamente eliminado y los últimos 75 ml son examinados directamente bajo una lupa estereoscópica. En animales viejos con tractos genitales muy descendidos, la manipulación del cervix y del útero se facilita mediante el uso de un forceps o pinzas cervicales. Si el fluido recolectado está sanguinolento, las células rojas pueden ser directamente lavadas a través del filtro por la apertura de las pinzas entre el filtro y el recipiente de la solución de lavado. El filtro nunca debe dejarse llenar por encima de su nivel superior, ni tampoco debe dejarse completamente sin líquido de lavado ya que los embriones se pueden desecar cuando se exponen al aire. El líquido puede mantenerse permanentemente en un volumen de 1 ml (Figura 1).

Durante la parte final de la recolección del líquido de lavado pueden administrarse unas 50 UI de oxitocina por vía venosa, lo cual ayuda a retirar la porción residual del medio de lavado de los cuernos del útero. En animales superovulados el procedimiento se repite en el cuerno opuesto. Mientras permanece en el útero es sumamente riesgoso reinsertar el estilete en el catéter de Foley, ya que este puede salir por una de las aberturas. Algunos veterinarios prefieren poner el catéter con el balón justo en el cuerpo durante el llenado y vaciado del útero aun cuando el balón fue puesto inicialmente en uno de los cuernos; cuando esto sucede se lavan ambos cuernos a la vez.

El modelo de catéter Rush (Memán) de 68 cm de longitud, es de goma roja, calibre 18 y con un estilete incluido. La punta del estilete se extiende 4,5 cm por delante del balón. La introducción de este catéter es semejante al de Foley, y es parti-

cularmente ventajoso para ser usado en animales viejos con úteros grandes y descendidos.

El lumen uterino es lavado por entrada y salida alterna del líquido. El tercer artefacto usado, en el lavado del útero, es una sonda larga y rígida con 3 vías de colección (IMV, Francia). Un canal sirve para inflar el balón, una segunda vía, es una cánula de acero inoxidable por donde se introduce el medio de lavado y un tercer canal un pequeño y flexible catéter el cual puede avanzar hacia la punta del cuerno, para recuperar el medio de lavado.

El último modelo de catéter (RUGOFER) es un diseño venezolano caracterizado por su seguridad, fácil construcción y menor costo. Como ventaja principal tiene la particularidad que el estilete metálico se fija en la extremidad anterior y posterior de la sonda, lo cual garantiza una completa seguridad de emplazamiento especialmente en ganado cebú y sus cruces, cuyo cervix es más largo y tortuoso que en los *Bos taurus*.

Cada uno de estos instrumentos de recuperación de embriones trabajan bien dependiendo de la experiencia adquirida por la persona que los aplica. El costo de cada uno de estos catéteres varía considerablemente.

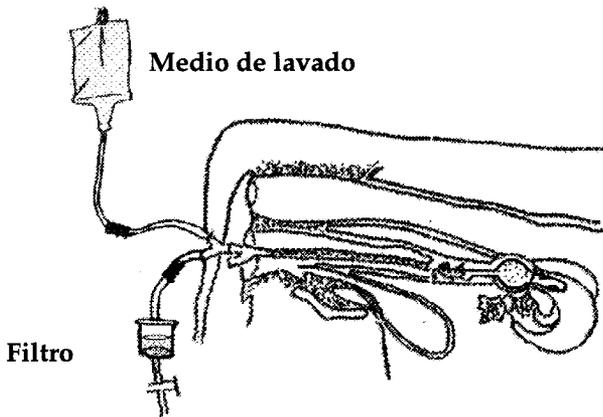


Figura 1. Diagrama de recolección no-quirúrgica de embriones.

Cuadro 4
Momento de recolección no quirúrgica de embriones

Días Post-Inseminación										
Fecundación		Permanencia en Trompas			Arribo y permanencia en útero					
0°	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10° =>
Inoportuno					Temprano			Ideal		Tarde

VII. PROCEDIMIENTOS PARA LA BÚSQUEDA DE LOS EMBRIONES

El equipo usado para la búsqueda de los embriones, es preparado mientras los embriones son recolectados en el filtro. De una a tres placas de petri desechables (100 x 100 mm) de fondo cuadrículado son usadas para búsqueda de los embriones presentes en cada uno de los filtros. Cada placa es marcada con el número de la donadora y con la secuencia como son llenadas con el medio de los filtros. El medio PBS fresco introducido en una jeringa de 30 a 35 ml en condiciones de máxima esterilidad y una aguja de 22g x 1" conectada a la jeringa se utilizan para lavar el filtro. El medio que quedó en el filtro como remanente del lavado uterino es puesto en la placa N° 1. El filtro es tomado en un ángulo de 45° lavando el fondo dentro de otra placa de petri. Será necesaria una mayor cantidad de líquido cuando hay presencia de muco en el lavado. Este paso, puede ser repetido una o dos veces más utilizando nuevas placas, hasta que el filtro quede completamente limpio (libre de muco, detritus celulares o restos de sangre). De 5 a 7 ml de suero fetal pueden ser adicionados a la placa de búsqueda de los embriones. Las placas son examinadas bajo la lupa estereoscópica (15X), siendo movidas a lo largo de las líneas de referencia hasta observar completamente su fondo. Cuando un embrión es identificado, se transfiere a una placa de petri pequeña, individual (35 x 10 mm) conteniendo medio PBS-Suplementado (PBS + 10 a 20% de suero fetal bovino) estéril. Todas las placas deben quedar tapadas durante el tiempo de la búsqueda a fin de evitar la contaminación y particularmente la evaporación. El embrión identificado es introducido en una micropipeta y observado nuevamente en el microscopio antes de ser transferido a una subsiguiente placa de mantenimiento. El número de embriones buenos o malos son tentativamente registrados sobre la placa. El número de cuerpos lúteos usualmente sirve como una guía para el número de embriones a ser buscados. Luego que todos los embriones de una vaca donadora son acumulados en un pequeño disco de mantenimiento, serán transferidos a través de 3 pequeñas placas con PBS + suero. Este procedimiento sirve para lavar a los embriones; debe utilizarse una pipeta diferente para cada lavado. Los embriones son ahora clasificados y preparados para el siguiente procedimiento: el cultivo, la transferencia o la espera para la congelación. La clasificación y observación se facilita bajo un gran aumento (70X), trabajando de preferencia a una temperatura adecuada (20-26°C). El sitio de trabajo debe estar completamente limpio, evitando el humo de cigarrillos, olores fuertes de detergentes, desinfectantes y la entrada de insectos o polvo.

VIII. MANEJO Y CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES

Una vez que el embrión es identificado en la placa de petri (cuadrículada), es transferido de inmediato a otra placa que contiene medio PBS más suero fetal bovino (SFB) al 10%, el cual ha sido esterilizado por filtración (poros 0,22 a 0,45 μ m). Como medio de mantenimiento se emplea generalmente el fosfato buffer salino (PBS), conteniendo penicilina más estreptomycinina y un 10 a 20% de SFB inactivo. (56°C, 30 min).

Los embriones son contados, tentativamente clasificados como buenos o malos y pueden ser fotografiados en la placa de petri con el medio de mantenimiento. Los embriones son entonces lavados, a través de tres diferentes pases en placas de petri, conteniendo medio de mantenimiento fresco y estéril, usando una nueva pipeta en cada paso. Finalmente ellos son puestos en una nueva placa de petri para esperar ser transferidos o congelados. Los embriones destinados a la exportación, deberían ser lavados a través de 10 diferentes placas conteniendo medio estéril de mantenimiento.

1. Clasificación de los embriones

Los embriones son generalmente clasificados en diferentes grupos basándose en su morfología y apariencia bajo la lupa. A continuación se muestra una clasificación por su calidad:

Embriones excelentes (calidad 1); no se observa en ellos ninguna clase de imperfección.

Embriones buenos (calidad 2); poseen muy pocas imperfecciones reconocibles, tales como una pobre compactación, variación en el número de células o bien un pequeño número de células extruídas.

Embriones de tipo regular (calidad 3); muestran mayor número de irregularidades tales como una pequeña masa embrionaria de forma irregular y un elevado número de células muertas ó extruídas siendo usualmente embriones de 1 a 2 días de desarrollo retardado.

Embriones pobres (calidad 4); muestran signos de degeneración celular, una pequeña masa embrionaria y muchas células extruídas o bien el citoplasma desintegrado. Generalmente el desarrollo embrionario está retardado en 2 días o más en estos embriones.

Embriones de muy pobre calidad (calidad 5); contienen todas las células muertas o muy pocas células vivas o bien una masa celular muy fina y una apariencia extremadamente desorganizada. Estos están compuestos principalmente de detritus y generalmente no son transferibles.

Otras categorías pueden ser consideradas para la evaluación de los embriones a fin de determinar su calidad:

1. Edad del embrión a partir de la fecha de selección.
2. Número de células presentes en el embrión.
3. Compactación de las blastómeras: una pobre compactación de las blastómeras puede ser inicio de un pobre desarrollo.
4. Forma de la masa del embrión; normalmente debería ser esférica y simétrica.
5. Color del embrión: un color verdaderamente oscuro, puede ser visto en los embriones de muy poca calidad, lo que podría indicar la acumulación de lípidos en el interior de las células.
6. Variación en el tamaño de las células: los embriones saludables poseen blastómeras homogéneas y del mismo tamaño.

7. La presencia de vesículas en las células: la función fisiológica y las propiedades de las vesículas no han sido bien descritas en la literatura. Embriones con grandes vesículas tienden a tener un pobre desarrollo *in vitro*.
8. El número de blastómeras extruídas desde la masa celular principal, en una mórula compacta o en un blastocisto son fácilmente identificables en el espacio perivitelino. Una vez que el blastocisto se ha expandido y que llena totalmente el espacio perivitelino, la identificación de células extruídas es difícil; esto puede deberse a que las células extruídas no son incorporadas dentro de la masa celular durante la compactación. Usualmente una pequeña cantidad de células extruídas o la presencia de algunas muescas podría impedir un adecuado desarrollo embrionario.
9. El porcentaje del espacio perivitelino ocupado por la masa celular principal es importante en la evaluación de la forma de la masa celular.
10. El conocimiento de la edad de los embriones es también necesario para poder asegurarse del estado de desarrollo del embrión, de acuerdo al día en el cual este fue colectado.
11. Generalmente en el bovino el embrión alcanza el útero al 4-5 día de iniciado el estro. Después de este tiempo puede ser recuperado no quirúrgicamente. Embriones recuperados 6 a 8 días luego del estro son clasificados morfológicamente dentro de diferentes grupos como se indica.

2. Clasificación morfológica (Figura 2)

Mórula: La masa embrionaria contiene 32-64 células. Las blastómeras son de forma redonda y no están estrechamente conectadas entre ellas.

Mórula compacta: La forma de la mórula compacta es similar a la de una pelota de golf. En la membrana extrema es ligeramente abombada en su apariencia debido a la compactación. Las blastómeras individuales no son fáciles de distinguir. Las células en la superficie de la masa son de forma poligonal.

Blastocisto Temprano: Un fino y claro espacio es visible, el cual contiene fluido. Esta área es el inicio del blastocele.

Blastocisto: La cavidad ó blastocele comprende más de 70% del embrión. Algunos grupos están presentes y son claramente reconocibles, como la capa trofoblástica, la zona pelúcida y la masa celular interna ocupando un lado del embrión. El espacio perivitelino es también visible.

Blastocisto expandido: El blastocele ocupa el mayor volumen del embrión. La capa trofoblástica está adosada a la membrana pelúcida eliminando completamente el espacio perivitelino. El disco embrionario se hace de fácil identificación y la membrana pelúcida reduce su espesor.

Blastocisto Eclosionado: Ha abandonado la membrana pelúcida y se caracteriza por ser una masa de células con variable compactación lo cual lo hace confundible con los detritus celulares presentes en el medio de lavado. El blastocisto eclosionado es mas susceptible a la contaminación y a la manipulación. Es la categoría más difícil para la identificación.

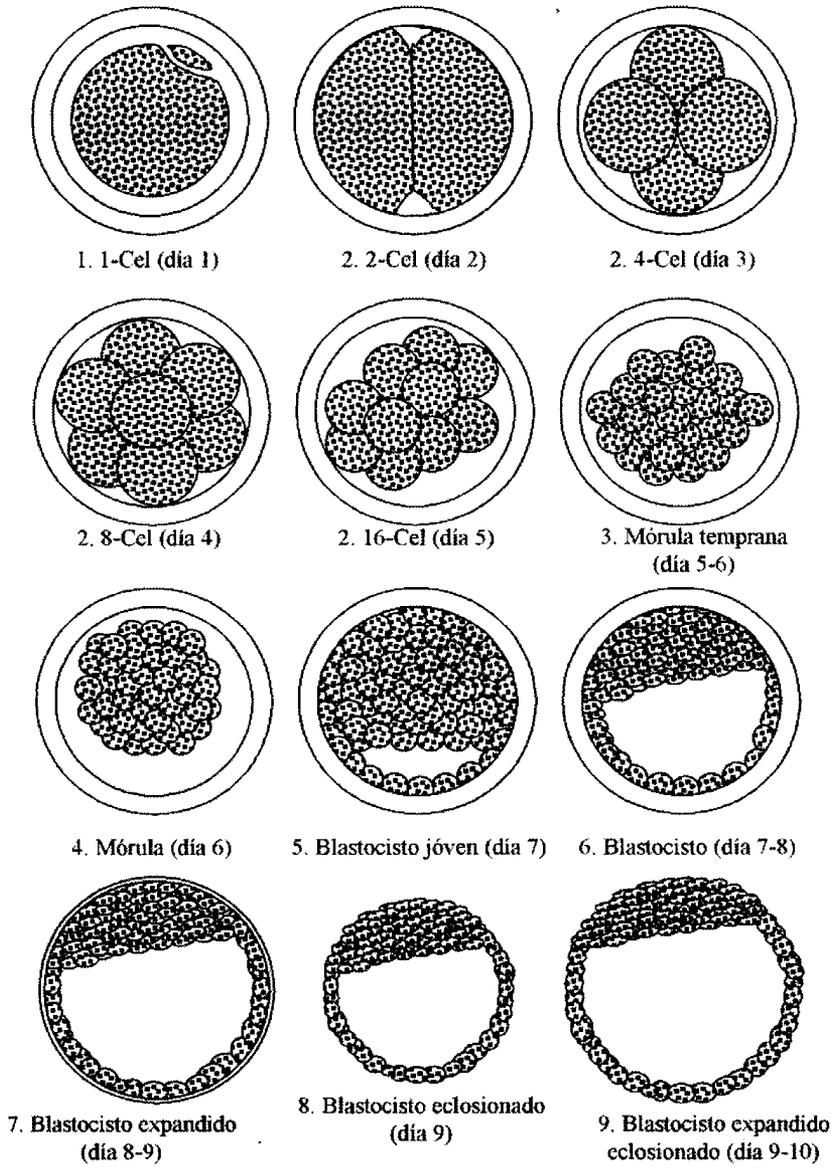


Figura 2. Diferentes etapas de desarrollo embrionario.

IX. MEDIOS PARA RECOLECCIÓN, MANEJO Y MANTENIMIENTO DE EMBRIONES

El fluido empleado para recolectar, almacenar o transferir embriones usualmente es denominado medio. Este medio debe sustituir al contenido del tracto reproductivo presente con los embriones. Varios medios diferentes pueden ser usados para los embriones pero el más popular y conocido es el Fosfato-Buffer-Salino (PBS) o también llamado solución Dulbecco's (Cuadro 5). Otros medios de cultivo celular como el Han's F10 y el TCM-199, son también utilizados para el mismo propósito.

En cualquier medio, el 95 a 99% de su composición es agua; es importante que esta sea relativamente pura, obtenida por destilación o desionización. El agua destilada no siempre resulta eficientemente adecuada por lo cual requiere de un subsiguiente tratamiento de purificación. El grado de pureza del agua es medido en función de la conductividad eléctrica siendo alrededor de 18 mhos. Las contaminaciones ordinarias del agua potable como lo son metales pesados (plomo, cadmio y zinc) y los componentes orgánicos (pesticidas y toxinas) producidos por las bacterias y hongos y otros microorganismos, afectan a los embriones.

En los medios, la presencia del cloruro de sodio equilibra la presión osmótica en el interior celular. Una concentración alta o baja de cloruro de sodio ocasiona concentración o hinchazón de las células respectivamente. Los fosfatos por su efecto buffer mantienen el pH alto (>7,0) y poseen baja concentración de iones hidrógenos (alcalinos). El agua pura y muchos fluidos tienen un pH neutro (7,0), sin embargo el agua puede fácilmente acidificarse; un ejemplo de ello es el agua de lluvia. Los fosfatos son adicionados en forma de fosfatos de sodio y fosfatos de potasio.

Otro ingrediente es el potasio el cual está presente en elevada concentración dentro de la célula. Ayuda a mantener las propiedades eléctricas de la membrana celular; en caso de producirse crecimiento y multiplicación de las células, el potasio debe estar presente en el medio. Otros dos componentes importantes son el calcio y el magnesio, ellos por su carga catiónica bivalente son necesarios para mantener la función enzimática celular. El suplemento proteico bajo la forma de albúmina, contiene átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre. La más común fuente de albúmina es el suero bovino, siendo denominado BSA (Bovino-Suero-Albúmina); algunos técnicos emplean simplemente BSA y otros, suero sanguíneo calentado (56° C por 30 min) para eliminar el efecto embriotóxico termolábil. Aún cuando las funciones del BSA son múltiples, la más importante es prevenir las adherencias de los embriones a la placa de petri u otros equipos. El medio sin la presencia de BSA, dificulta extremadamente el manejo de los embriones con la pipeta.

Otras sustancias necesarias son los antibióticos y antimicóticos pues previenen el crecimiento de microorganismos. Los antibióticos más comúnmente usados son Penicilina, Estreptomicina y Kanamicina en proporciones bajas de 100 UI/ml, 100 mcg/ml y 250 mcg/ml respectivamente. Como antimicótico se aplica Anfotericina-B en concentración de 0,25 mcg/ml. A pesar de que los medios son sometidos a esterilización por filtración (poros 0,22 µm), es imposible prevenir las

contaminaciones durante los procedimientos rutinarios de trasplantes de embriones.

Ingredientes opcionales son la glucosa y el piruvato de sodio, cuya función es servir de fuente energética. Si los embriones permanecen menos de 12 horas fuera del ambiente uterino, estas sustancias energéticas son poco necesarias ya que las células del embrión han almacenado sustancias de esta naturaleza. Si los embriones van a permanecer tanto tiempo como 24 horas, deberían proporcionarse al medio moléculas energéticas para lograr mejores resultados. El medio PBS, es un medio simple que cumple con los requisitos necesarios en la tecnología del trasplante y su sencilla formulación lo hace un medio muy económico y de fácil preparación.

Cuadro 5
Solución Buffer – Fosfato – Salina (Dulbecco's)
(Formula para preparar 10 litros)

PARTE A		PARTE C	
NaCl	80,0 gr	Ca CL ₂ 2H ₂ O	1.325 gr
KCL	2,0 gr	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.312 gr
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	21,7 gr	Disolver en 2 litros de agua desionizada.	
KH ₂ PO ₄	2,0 gr	Adicionar parte C a la solución A + B	
Glucosa	10,0 gr		
Disolver 4 litros de agua destilada desionizada			
PARTE B			
Dextrosa	10,0 gr	Chequear pH y osmolaridad	
Na Piruvato	0,36 gr	Filtrar (0,22 µm de porosidad)	
Na Penicilina G 1.000.000 UI			
Dihidroestreptomicina	1,0 gr	Cambiar el filtro durante el procedimiento del filtrado	

X. MONTAJE DEL EMBRIÓN PARA EL TRANSPLANTE DIRECTO

Si no hay necesidad o interés de congelar los embriones, estos se colocan en una placa de petri para su mantenimiento o son depositados en un tubo plástico (poliestireno) para el transporte a distancia hasta por 18 horas después de la recolección o son trasplantados inmediatamente en el sitio.

Los embriones para ser trasplantados directamente deben ser colocados en una placa de petri conteniendo medio de mantenimiento. Se marca esta placa con el número de la donadora. Al mismo tiempo marcar una segunda placa conteniendo medio de mantenimiento, identificándola como "PBS". Mantenga separadas las placas de cada donadora y recuerde la identificación de cada una de ellas.

Clasifique los embriones según el grado de desarrollo, por ejemplo, Mórula temprana (M1), Mórula avanzada (M2), Blastocisto temprano (B1), Blastocisto expandido (B2), Blastocisto eclosionado (B3).

Recuerde que las receptoras deseadas para colocar los embriones son aquellas que exhibieron celo un día antes, el mismo día o un día después del celo de la

donadora; ellas además deben poseer un adecuado cuerpo lúteo que debe haber sido detectado el día anterior al transplante.

Cuando se conoce que una determinada donadora ha producido en el pasado hijos con un toro conocido; no debemos olvidar de colocar en lo posible dichos embriones en vacas en vez de novillas.

Cuando el número de embriones a ser transferidos es grande, siempre se desea acortar el tiempo de cada transplante. Una lista ordenada debería elaborarse previamente indicando la secuencia de las receptoras. Esto simplifica y hace más eficiente el trabajo. Otro detalle importante es ir montando tres o cuatro pajuelas con embriones simultáneamente.

Una vez que los embriones son asignados a la receptora deben establecerse los siguientes controles:

1. Identifique cada receptora con un arete de control del embrión transplantado. Utilice tinta permanente para anotar el número de la donadora, el toro y la fecha al anverso del arete. Imprima detrás del mismo el número de la receptora. Coloque el arete a la receptora inmediatamente después del transplante.
2. El sistema para transplantar el embrión involucra la utilización de una pajuela estéril de 0,25 ml, la pistola de T.E., la funda de protección de la pistola y la camisa sanitaria.
3. Coloque la placa de petri conteniendo los embriones de una determinada donadora sobre el microscopio.
4. Abra un paquete de pajuelas estériles e identifique cada una con el número de la donadora, número y calidad del embrión. Utilice un marcador fino indeleble.
5. Inserte la pajuela en una jeringa de tuberculina (1 ml) previamente preparada para pajuelas de 0,25 ml. Lave la pajuela por aspiración de 0,2 ml con la jeringa. Introduzca primero 2 ml de líquido dentro de la pajuela, aspire una burbuja de aire (0,7cm) luego otra columna de 3 ml conteniendo el embrión, seguido de otra columna de 3 ml de líquido (Figura 3). Desplace el émbolo de la jeringa fuera del líquido de la placa hasta que la primera columna de líquido introducida toque el tapón original de la pajuela, humedeciendo el mismo.
6. Envase el embrión correctamente, proceda al sellado de la pajuela con el tapón plástico donde se anotaran los datos del embrión. Otro procedimiento de sellado es utilizar una termoselladora o una pinza mosquito previamente calentada.

XI. TRANSPLANTE DEL EMBRIÓN PROPIAMENTE DICHO

Las receptoras deben ubicarse en el corral próximo a la manga de trabajo, introduciéndolas lentamente dentro de ella. La manga debe tener una capacidad mínima para 4 ó 5 receptoras a la vez, debiendo finalizar en un brete o cepo fuerte y seguro.

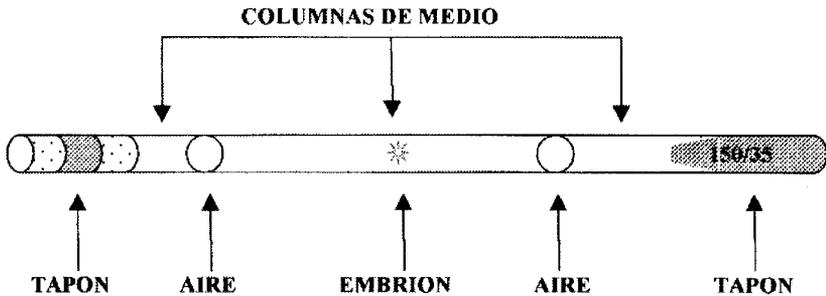


Figura 3. Montaje del embrión dentro de la pajuela

Una vez inmobilizada la receptora se procede a cumplir con los siguientes pasos:

1. Lavado y desinfección del tren posterior del animal,
2. Realizar la anestesia epidural con 5-6 ml de Novocaína o Lidocaína al 2%,
3. Colocarse un guante plástico lubricado con parafina líquida o gel,
4. Introducir la mano dentro del recto y proceder a retirar cuidadosamente las heces,
5. Una vez lograda una adecuada insensibilidad (relajamiento total de la cola), un ayudante levantará la misma fijándola a nivel de su base,
6. Revisar el estado de higiene de la vulva y vagina. Cuando use Betadine, evite que el desinfectante penetre dentro de la vagina ya que resulta tóxico para el embrión,
7. Con el brazo dentro del recto y habiendo fijado el cervix, proceda a introducir la pistola con el embrión. El ayudante deberá fijar los labios vulvares retrayéndolos hacia atrás y afuera mientras el operador tira el cervix hacia delante. Esta sencilla operación distiende las paredes vaginales facilitando el avance de la pistola hasta la entrada del os-cervix. Inicialmente la pistola deberá introducirse hacia arriba en un ángulo de 45° para obviar el orificio suburetral. Una vez que la pistola ha alcanzado el cervix se procede a romper la camisa sanitaria.

El siguiente proceso es atravesar el canal cervical mediante manipulaciones semejantes a las de la inseminación artificial. El embrión debe ser depositado en el tercio medio del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo (Figura 4). Esta etapa intrauterina debe hacerse muy cuidadosamente debido a la debilidad del endometrio, cuya lesión puede afectar considerablemente el desarrollo del embrión. Como lubricante ideal recomendamos la parafina líquida (aceite mineral) o un gel lubricante por ser menos tóxicos y facilitar con comodidad la introducción del brazo en el recto. Es muy importante anotar en la planilla de los transplantes todos los datos referentes al embrión y de la receptora, así como las observaciones sobre el procedimiento de la operación.

Después del trasplante las receptoras deben recibir un adecuado manejo tanto nutricional como de vigilancia veterinaria. La ubicación de los animales en potreros sin sombra y bajo intensa irradiación y humedad puede afectar considerablemente la tasa de preñez. Las labores de vacunación, baños garrapaticidas, inyecciones vitamínicas y otras, deberán ser suspendidas durante la etapa temprana de la preñez. Las receptoras serán recogidas dos veces diarias para registrar la repetición del celo de aquellas que no resultaron gestantes. El diagnóstico de preñez será efectuado 40-45 días post trasplante. El resultado de fertilidad debe tener un promedio de alrededor de 60% para embriones frescos y 40-50% para los congelados.

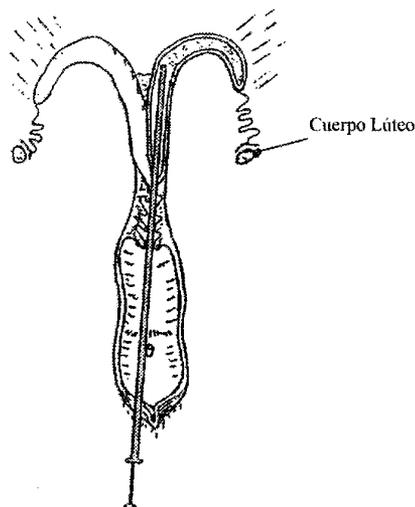


Figura 4. Ubicación de la pistola en el momento de la deposición del embrión en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo.

XII. LECTURAS RECOMENDADAS

- [1] Cattle Embryo Transfer Procedure. 1990. J. L. CurtIs, Agtech Inc., Manhattan KS.
- [2] El Ganado Brahman, en el umbral del siglo XXI. 1996. Mem. Cong. Mundial de la Raza Brahman. Maracaibo, Venezuela, González, R. Mejoramiento del ganado Brahman en Venezuela a través del trasplante de embriones. Cap. XV
- [3] Embryo Transfer in Cattle, Sheep and Goats. 1982. Australian Society for Reproductive Biology,
- [4] Embryo Transfer in dairy Cattle. 1989. Saidel O.E. and Elsen, P. Hoard's Dairyman.
- [5] Embryo Transfer in Farm Animals: A Review of techniques and applications 1997. Betteridge, K.J. Canada Department of Agriculture.
- [6] Ganadería Mestiza de doble propósito. 1982. González, R. Trasplante de Embriones en Bovinos Mestizos de Doble Propósito. Cap. XII.

- [7] Manejo de Ganadería de Doble Propósito. 1995. González, R. Pautas para el establecimiento de programas de inseminación artificial y trasplante de embriones en ganaderías de doble propósito. Cap. XXVIII.
- [8] Manual de Entrenamiento de Transferencia de Embriones en Bovino. 1996. Drost, M. University of Florida.
- [9] Manual of International Embryo Transfer Society (A procedural guideline and general information of the use embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures). 1970. Stringfellow, D.A. and Seidel, S.M. eds. Second Edition.
- [10] Proceeding of the Round Table Meeting on Sanitary Problems Related to Embryo Transfer. 1985. Paris, 9 December. Organized by the OI and the IETS.