

BAC

MODULO DIGITAL



El documento fuente se encuentra en
La Biblioteca Agropecuaria de Colombia

ELEMENTOS BIBLIOGRAFICOS

AUTOR (ES): Restrepo V, A.

TITULO: Avances en el transplante de embriones en bovinos

FUENTE: 8. Jornadas de Medicina Veterinaria y Producción Animal,
Manizales (Colombia), 7-9 Oct 1981. Memorias. Manizales (Colombia),
Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas de Caldas, 1981. p.
92-101

92

AVANCES EN EL TRANSPLANTE DE EMBRIONES EN BOVINOS

M.V.Z. ALVARO RESTREPO V.

INTRODUCCION:

Desde hace varios años, se han venido realizando una serie de experiencias en transplantes de Embriones en la especie bovina, en Colombia, tendientes a lograr la capacitación profesional y la comercialización de tan movísima e impactante técnica reproductiva.

En Colombia se iniciaron trabajos en especies menores (Conejos), alcanzándose éxitos sorprendentes. Posteriormente y a medida de adquirir un mayor conocimiento de las diferentes técnicas, se realizaron los primeros transplantes en la especie bovina. Actualmente se han alcanzado los niveles necesarios que permiten la aplicación comercial de dichas técnicas.

Varias entidades y particulares han colaborado tanto económicamente como en la capacitación de una serie de profesionales, que actualmente nos permiten conocer los avances del transplante de embriones en nuestro país.

Cabe mencionar algunas de las entidades y/o particulares agradeciéndoles sus esfuerzos. Tales son:

Fondo Ganadero de Caldas.
Uniban
Hacienda "Los Naranjos"
Organización Ardila Lulle.

VACAS DONADORAS:

Para nuestro estudio se han tomado en cuenta dos grupos de animales identificados así:

DONADORAS
RECEPTORAS

DONADORAS:

Se denominan donadoras o Dadoras de embriones, a aquellas hembras bovinas genéticamente puras, de alto valor, que son las encargadas de suministrar los embriones.

REQUISITOS DE UNA DONADORA IDEAL:

- Pura genéticamente
- Buena conformación y sin defectos genéticos detectables
- Con una edad que fluctue de 3 a 8 años

- Que no presente o se sospeche de haber padecido problemas reproductivos.
- Ciclos normales y regulares desde temprana edad
- Con dos o más celos observados
- Con uno o dos servicios por concepción
- Sin dificultades al parto y sin irregularidades reproductivas.
- Sin anomalías sistémicas
- Saludable y con ganancia de peso
- No lactante
- Previamente que haya suministrado embriones aptos.

SUPEROVULACION:

Un total de 90 donadoras han sido sometidas a tratamiento superovulatorio. Este consiste en la aplicación de Hormonas a base de FSH-P (Hormona Folículo Estimulante). También es posible emplear drogas a base de suero de Yegua preñada (PMSG). Estas se suministran en combinación de agentes luteolíticos o con la presentación natural del celo.

Estos tratamientos se pueden iniciar en el período comprendido, entre el día 10 - 13, de su último celo presentado. Se realizan dos aplicaciones diarias con intervalo de 12 horas, durante cinco (5) días, a dosis de 38 - 50 mg. de FSH-P, vía intramuscular.

Las donadoras reciben Prostaglandinas (Lutalyse, Estrumate), el cuarto (4) día de iniciado el tratamiento de superovulación las dosis de Prostaglandinas utilizadas varían de 25 - 35 mg. vía muscular. Se han empleado aplicaciones sencillas y fraccionadas.

Algunos resultados superovulatorios se presentan en la Tabla 1.

REGIMENES SUPEROVULATORIOS:

Hay un sinnúmero de regímenes superovulatorios empleados con éste fin. Las preferencias por uno u otro sería de acuerdo a experiencias alcanzadas con cada uno de ellos.

- REGIMEN PMSG:

- A. PMSG (1000 - 3000 ui)
 72 horas
 PGF 48 horas
 ESTRO E..... Inseminación.

- REGIMEN FSH - P:

- B. 3.0 mg.
 4.0 mg.
 5.0 mg.
 5.0 mg.

6.0 mg.
 6.0 mg.
 5.0 mg.
 5.0 mg.
 4.0 mg.
 3.0 mg.

70.

Estro e Inseminación.

TABLA No. 1. NUMERO DE CUERPOS LUTEOS OBTENIDOS (FSH-P) DE DIFERENTES RAZAS BOVINAS.

RAZA	DONADORAS #	NUMERO DE CUERPOS LUTEOS			TOTAL	DONADORA (X)
		0-4	5-10	10+		
Cebú Brahman	47	16	20	11	355	7.55
Pardo Suizo	16	2	6	8	145	9.06
Chianina	7	-	4	3	65	9.28
Romo Sinuano	7	3	3	1	36	5.14
Harton Caucano	8	2	4	2	70	8.75
Otros *	5	3	2	-	22	4.4
TOTAL.....	90	26 (28.88)	39 (43.33)	25 (27.77)	693	7.36

* MESTIZO HOLSTEIN

CLASIFICACION DE LOS REGIMENS SUPEROVULATORIOS:

- Dosis creciente
- Dosis creciente - Decreciente
- Dosis estática
- Dosis decreciente.

INSEMINACION:

Las vacas y/o novillas donadoras son inseminadas con múltiples dosis de semen de acuerdo a varios programas, cuando el semen no es conocido, grandes cantidades pueden ser usadas. Cuando se ha decidido que programa es el adecuado, luego de considerarse, los factores concernientes a costos, viabilidad, fertilidad, un posible programa para inseminar ésta donadora puede ser empleada, una o dos unidades de semen a las 6, 18, y 32 horas de iniciado el celo.

Excepto en casos muy especiales las cantidades de semen son muy limitadas. Un semen de pobre calidad puede causar infertilidad en los óvulos.

ASPECTOS RELACIONADOS CON LAS RESPUESTAS SUPEROVULATORIAS:

- Se han hallado diferencias en las respuestas entre el ganado de leche y carne. El ganado de leche muestra una mayor sensibilidad a las ganadotropinas.
- Dentro de aquellas razas especializadas en carne se han presentado diferencias.
- Vacas que han tenido una cría, tienen una mejor respuesta que novillas vírgenes o vacas viejas.
- Obviamente, vacas con enfermedades genitales o sistémicas no diagnosticadas y repétidoras de servicios, no son deseables en éstos programas, por presentar respuestas inciertas.
- Las donadoras presentan una gran variabilidad a las respuestas superovulatorias y se pueden hallar diferencias significativas entre varios ensayos superovulatorios en la misma vaca.

A continuación analizaremos dos cuadros, en los cuales se resumen, el Índice de la Colección, y la presentación de las diversas formas embrionarias.

TABLA No.2 RECUPERACION DE EMBRIONES VIA CERVICAL.

NUMERO DONADORAS	90	(X)
Número de ovulaciones determinadas por palpación rectal.	693	7.36
Número de embriones colectados	499	5.54
TAZA DE COLECCION:		
<u>Número de embriones</u> x 100	72%	
Número de cuerpos lúteos		

El paso de los embriones al útero es completo entre el día 3 y 5, pero un 10% pueden permanecer en el oviducto hasta el día 8.

Un 7% de los embriones pueden hallarse en el oviducto, 73% in los 10 cms. anteriores del cuerno uterino, y un 20% en la base del cuerpo.

COLECCION DE EMBRIONES:

A través de la historia del transplante de embriones en la especie bovina se han empleado dos técnicas tendientes a la extrac-

ción, de dichas células situadas en el lumen de los cuernos uterinos. Dichas técnicas se conocen con los nombres de:

- COLECCION QUIRURGICA
- COLECCION NO QUIRURGICA

- COLECCION QUIRURGICA:

La vaca seleccionada como apta para ser sometida a procesos de colección de embriones, es sometida a un ayuno por 24 horas. Luego será trasladada a la sala de cirugía, donde es premedicada y anestesiada por intubación. Luego de situarse en la mesa de cirugía, es depilada y desinfectada en el sitio donde se realizará la incisión. Será aproximadamente 15 cms, anterior a la glándula mamaria, en la línea media. Uno de los cuernos uterinos es localizado, sometido, a extracción manual. La fimbria y el ovario son fijados para posteriormente ser canulados para ser lavados varias veces con soluciones salinas o cualquier otro medio de cultivo. Luego el órgano es retornado a su cavidad y se repite similar proceso en el siguiente.

Algunos cirujanos utilizan Heparina (10 USP) para reducir la formación de fibrina y posteriores adhesiones. Al cerrar la incisión, el peritoneo y tejidos musculares siguientes son suturados con materiales absorbibles con puntos simples interrumpidos. Finalmente la piel es cerrada con puntos simples con materiales sintéticos.

Algunas vacas presentan severas reacciones a éstas u otras muchas suturas causando seromas que son problemas temporales.

Los problemas con seromas observados pueden alcanzar al 10%, suturas infectadas 0.5%, herniaciones 1%, pero dentro de buenos sistemas de manejo, éstos factores son insignificantes. La sutura de la piel es renovada a los 10 días.

RELACION DE VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL METODO QUIRURGICO Y NO QUIRURGICO EN LA COLECCION DE EMBRIONES:

METODO QUIRURGICO:

- Ventajas:

- Paciente inmóvil
- Técnica con mucha asepsia
- Manipulaciones directas del útero
- Segura evaluación de la respuesta ovárica
- Solamente es necesario de 20 - 50 cc. del medio

- Desventajas:

- Formación de adhesiones
- Facilidades necesarias para la cirugía

- Se requiere destreza en las manipulaciones
- La anestesia general es necesaria
- Dificultades en animales lactantes
- Requiere ayuno
- Requieren período de recuperación.

METODO NO QUIRURGICO:

- Ventajas:
 - Repetible
 - Puede ser realizado a nivel de finca
 - No requiere ayuno
 - No hay cirugía
- Desventajas:
 - Se requiere destreza en las manipulaciones
 - Se utilizan 500 - 1000 cc. de medio por vaca
 - Los procesos estériles se dificultan
 - Solamente pueden ser realizadas en animales que su canal cervical permita el paso.

COLECCION NO QUIRURGICA:

Todas las donadoras son previamente depiladas y desinfectadas en el sitio en el cual se va a realizar la anestesia epidural con xilocaina al 2% con Epinefrina. Las estructuras externas del aparato genital femenino son previamente desinfectadas.

La sonda de Foley número 20 es insertada en el cuerpo o en cada cuerno uterino. Luego de lograr su paso por el cuello, es retirada la guía metálica. Posteriormente es insuflada con aire o agua destilada la perilla plástica situada en el extremo anterior de la sonda.

Los embriones son extraídos del útero por medio de líquidos específicos y agregados de nutrientes y sustancias energéticas.

MODIFICACIONES A LA TECNICA:

- Colección con agitación y gravedad
- Colección por gravedad sin agitación
- Colección con agitación por aspiración
- Colección por aspiración sin agitación

MEDIOS DE CULTIVO:

A través de los años se han utilizado una serie de medios de cultivo, los cuales han mostrado una respuesta muy variable. A continuación daremos ejemplos de algunos de ellos.

AUTOR/AÑO

MEDIO/TRATAMIENTO

EMBRIONES

RESPUESTA.

Seidel y Col. 1971	Hans F-10 Modificado TCM. 199	17 15	1.3 0.7
Tervit	Sintetic Oviduct Fluid	10	80%
Whitinghan 1972	(SOF)	5	50%
Seidel 1974	TCM - 199+ Hepes + 5% Serun	88	53%
Karagawa y col. 1975	BMOC - 3 SOF	108	65%-80%
Trounsen. Willandsen Modified Dulbeccós		33	85%
Rowson y Newcomb 1976	PBS	24	88%
	TCM - 199	45	49%
Trounson, Willadsen Modified PBS +		66	82%
And Rowson 1976	20% de FCS.	65	62%

EMBRIONES:

Uno de los aspectos más importantes en el éxito del trasplante de embriones es el conocimiento y cultivo de los embriones. Hay un sinnúmero de factores que pueden alterar la calidad de los embriones a transferir. Actualmente se observan ocho elementos principales para la apreciación de un blastocisto obtenido por superovulación.

**APRECIACION DE UN BLASTOCISTO OBTENIDO POR SUPEROVULACION.
OCHO ELEMENTOS DE OBSERVACION:**

- ZONA PELUCIDA
- ESFERICIDAD, sin fisuras, traslucida
- BLASTOCISTO:
- Forma general, regular.
- Opacidad
- Estructuras visibles, trofoblasto, botón embrionario, blastocelo.

CELULAS:

- Grado de agregación de células: Aspectos de los contornos celulares.
- Variación del tamaño entre las células:
- Células situadas dentro del espacio perivitelino.

- Integridad de las células: Presencia de vacuolas, dispersión del material celular, granulaciónes en su cara.

TABLA No. 3. CLASIFICACION DE EMBRIONES.

CATEGORIA	NUMERO DE EMBRIONES	%
Embriones normales	338	67.73
Embriones no fértiles	106	21.24
Embriones degenerados (Retardados)	55	11.03
TOTAL.....	499	100

RECEPTORAS:

Los animales receptores pueden ser hembras de raza definida, más algunos parámetros que deben ser observados para obtener los mejores resultados de preñez en los embriones transferidos.

Los animales deben ser jóvenes, siendo aptos para la reproducción. El control sanitario debe ser completo, alimentación adecuada, rica principalmente en carotenos, sus sustancias que pueden interferir con el mecanismo hormonal de estos animales su premamente dóciles, disminuyéndose de ésta forma el constante Stress causado por las alteraciones de manejo. Todo esto facilitará la realización de el transplante de embriones. La observación de los celos estrales por tres veces al día de las receptoras permitirá controlar y conocer cada conducta animal.

REQUERIMIENTOS PARA UNA RECEPTORA IDEAL:

- Fácil selección de un número suficiente
- Novillas vírgenes sin anomalías reproductivas detectables
- Con uno o dos partos sin evidencia de anomalías reproductivas.
- Ciclos regulares
- De gran tamaño y con adecuado diámetro pélvico .
- Con una adecuada producción de leche
- Saludable, vacunada, libre de ectoparásitos.
- A los exámenes sanitarios libres de enfermedades contagiosas
- Aislada de otros grupos de animales desconocidos en relación a su estado libre de entidades infecciosas.
- Buena alimentación y ganancias de peso
- Apariencia femenina .

SINCRONIZACION:

Dosis similares a las aplicadas a las donadoras son utilizadas en aquellas receptoras que se encuentran en el período comprendido entre el día 5 al 16 del ciclo, con el fin de inducir su celo para que puedan albergar los embriones obtenidos de las donadoras programadas. Se utilizan receptoras que presentan celo el mismo día que la donadora, identificándose como en fasa (0); aquellas que presentan celo un día antes (+1), y las de un día menos (-1), son utilizadas como aptas para recibir embriones. Es conveniente aclarar que se pueden utilizar novillas con celo natural o inducido que cumplan las normas anteriormente enumeradas.

TRANSPLANTE DE EMBRIONES:

Luego de colectados los embriones, clasificados y cultivados en medios de cultivo especial, son transplantados a diversas novillas y/o vacas denominadas receptoras.

Previamente a cada una de estas receptoras, se le ha realizado una exploración rectal-ovárica, con el objeto de determinar la presencia de un cuerpo lúteo funcional, para trasladar el embrión al cuerno ipsilateral a dicha estructura.

Hasta el momento se conocen dos técnicas por las cuales se transfieren los embriones anteriormente seleccionados.

TECNICA QUIRURGICA

TECNICA NO QUIRURGICA

TECNICA QUIRURGICA:

Empleada actualmente en un sinnúmero de clínicas de transplante de embriones por permitir niveles de concepción que varían de un 30% - 80% de preñez.

Las recipientes son situadas en un brete que permita restringir al máximo sus movimientos. A estas receptoras se les administra tranquilizantes. El lado en el cual fué localizado el cuerpo lúteo es preparado para realizar una incisión paralumbar. Rutinariamente es depilada y desinfectada al igual que la infiltración de anestésicos locales. Inmediatamente al frente del iliun la infección es realizada a través de la piel y el músculo, oblicuo abdominal externo. El oblicuo abdominal interno y el recto abdominal son separados, el peritoneo es incidido. Luego, de confirmar la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario, es tomado el útero del ligamento ancho y exteriorizado. Una puntura es realizada dentro del lumen, para que permita el paso y la situación del embrión albergado en la micropipeta. El embrión es situado en el lumen del útero a unos 5 cms. de la unión útero tubal. La incisión es cerrada en tres capas y las novillas son retornadas a su sitio en el mismo día.

A las recipientes le son observados el retorno de sus celos y es examinada su preñez en un tiempo apropiado.

TECNICA NO QUIRURGICA:

Técnica en la cual se utilizan los mismos elementos requeridos en la Inseminación Artificial.

Luego de seleccionados y clasificados los embriones, son situados dentro de un straw de 0.25 ml. El llenado consiste en una columna de medio, columna de aire, columna de medio con el embrión, columna de aire, seguida por una columna de medio. El straw es situado en la pistola de I.A., luego su funda correspondiente, revistiéndose todo el equipo con una funda plástica. Cada recipiente es utilizada en el día 6 - 8 de su ciclo, a las recipientes previamente se les administra anestésico, epidural (5-10 cc), antes de realizar el transplante. La pistola con el straw es manipulada a través del recto. El instrumento es insertado lo más profundamente posible en el cuerno ipsilateral al ovario poseedor del cuerpo lúteo. El manejo para las receptoras es similar a las transferidas por el método quirúrgico.

PREÑEZ Y PARTOS:

La incidencia de eventos no deseable no es altamente lesivo. Entre los días 50 - 90, de gestación de un 3% - 5% de índices de abortos puede ser esperados. Es usual que un 2% - 3% menos suceda en el día 90.

Las recipientes preñadas pueden exhibir signos de estro a intervalos regulares o irregulares, similares a las vacas preñadas por concepción natural. No hay ninguna alteración en su relación de sexo, ni reportes de un aumento de los defectos congénitos de las crías obtenidas por T.E.

En el tiempo del parto, usualmente se presta una atención extra a la recipiente por el valor de su cría. El grado de asistencia requerida depende del manejo de la finca, el genotipo del ternero y el grado con que fué realizada la selección de la receptora. Generalmente cuando hay duda en un parto, puede ser inducido, se pueden realizar cesareas y llegar inclusive, al sacrificio de la receptora utilizada.

FUTURO DEL TRANSPLANTE DE EMBRIONES:

El transplante de embriones a nivel industrial a sufrido una rápida transición de la técnica quirúrgica a la no quirúrgica, similar al cambio ocurrido con los procesos de recuperación quirúrgica a la no quirúrgica.

Pese a haberse simplificado las técnicas, los costos continúan altos debido al bajo incremento de los porcentajes de preñez.

Recientemente el número de preñeces obtenidas con embriones congelados es la mitad que la de los sin congelar.

Otra área de gran interés es el sexaje de embriones. Varios Laboratorios están trabajando en métodos basados en anticuerpos de tejidos de machos. Serán necesarios varios años de Investigación hasta alcanzar su máxima viabilidad.

Docenas de otros avances han comenzado, por ejemplo: Puede ser posible renovar el óvulo de un animal viejo de alto valor genético que vaya a ser sacrificado, fertilizando éste en un tubo de ensayo y congelar docenas de embriones obtenidos así y ser utilizados más tarde.

Otra excitante técnica es la microinyección de esperma directamente dentro del óvulo. Millones de espermatozoides son utilizados por I.A. una sola inyección puede reducir estas cantidades.

Otra variación es la inyección de dos espermias y la renovación microquirúrgica del componente genético femenino. Esto puede resultar una cría con dos padres genéticos y sin madre genética.

Otra área con gran promisión es la participación de embriones en dos, para obtener mellizos idénticos.