

Cuadro VIII. Efecto de calidad del embrión en la tasa de preñez

CALIDAD DEL EMBRION	No. de Embriones Transferidos	No. de Preñeces	Porcentaje
Buena	1809	1272	70
Regular, pobre	694	380	55
TOTALES	2503	1652	66

Tomado de Schneider, H. J. et al (1980)

REFERENCIAS:

- Scheider Je, H.J. Castleberry, R.S, and Griffin J.L. Commercial aspects of bonne embryo transfer. *Thenogenology* (1980) - 13 - 1; (73-85).
- Elsden, R.P, Nelson, L.D. and Seidel Ja, G.E. Embryo transfer in fertile and infertile cows. *Thenogenology* (1979) - 11 - 1: (17 - 25)
- Betteridge, K.J. (1977) Summary of factors affecting success rate in singical embryo transfer. En: *Embryo Transfer in Farm Animals*. Ed. K.J. Betteridge.
- Elsden R.P., Master, J.F. and Seidel J.R., G.E. (1976) Non - surgiced recovery of bovine eggs. *Thenogenology* 6, (523-532).
- Schneider, U and Hahn, J. Bovine embryo transfer in Germany. *Thenogenology* (1979) 11-1: (63-80). Grefe, T and Lehn - Jensen Henkik Current Status of embryo transplanta hon in Denmark. *Thenogenology* (1979) 11 - 1: (99).
- Nelson, L.D., Seidel Jr. GE, Elsden, R.P. and Bowen, R.A. Superovulación of Cows using follide Stimulating hormone and Prostaglandin F2 *Thenogenology* (1979) - 11 - 1: (104).

EVALUACION DE EMBRIONES BOVINOS

RODRIGUEZ, H.
Dpto. de Reproducción Animal
C.I.VET - M.A.P.
D.V.M.Sc (Uppsala)

INTRODUCCION

El desarrollo temprano de los blastocistos bovinos en el momento habitual de transferencia -experimental o comercial- correspondiente a los 7 días postovulación es un proceso ciertamente crítico. Para sobrellevar un desarrollo posterior es necesario que la diferenciación celular del macizo celular interno y la capa trofoblástica, así como la formación del blastocele, ocurran. Ello es bien ostensible cuando tenemos datos numéricos de transferencias y número de gestaciones logradas correlacionados en forma positiva con una clasificación que aunque con claros resultados es pobre y arbitraria.

Diferentes técnicas, y diferentes criterios han sido empleados para valorar la futura viabilidad de los embriones como paso previo a su transferencia. Es el principal motivo de esta disertación hacer un sumario -breve- de las principales técnicas y metodologías utilizadas para la evaluación de embriones bovinos pre-transferencia, cuando se trate tanto de embriones recién colectados como de los conservados "in vitro" o sometidos al proceso de almacenamiento en condiciones de congelación.

BREVE RECORDATORIO MORFO-FISIOLOGICO

Tomando el día 0 como el día del estro en bovinos, el clivaje del cigoto comienza en el día 2 y desde allí se produce la segmentación hasta la aparición de una mórula en el día 6 al final del cual el embrión hace su entrada en la cavidad uterina. En el día 7, cuando ya comenzó el proceso de blastulación, con la diferenciación cada vez

más clara de trofoblasto y macizo celular interno, es cuando se realizan rutinariamente las colecciones no quirúrgicas por lavado de la cavidad uterina. De modo que este es el elemento celular que corresponde evaluar, el **blastocisto bovino** en sus diferentes grados de desarrollo, aún circunscripto dentro de su membrana pelúcida.

METODOLOGIA DE EVALUACION

Diferentes metodologías han sido seguidas, y dentro de ellas las que más han prosperado han sido las morfológicas, en las cuales toda la gama de parámetros posibles han sido tomados en cuenta, tales como la presencia o ausencia de zona pelúcida, la diferenciación grosera del botón embrionario, tamaño del embrión, etc. No obstante ello también se han desarrollado técnicas más refinadas como por ejemplo, las bioquímicas o fluorescentes, sobre las cuales volveremos más tarde.

De modo que, por considerarlas más próximas a nuestras posibilidades inmediatas, hemos de tratar con más detalle las técnicas morfológicas, sobre todo aquellas cuya necesidad de instrumental es mínima.

Muchos han sido los trabajos publicados respecto a la morfología de los blastocistos bovinos post colección (1, 2, 3, 4) y a partir de ellos puede clasificarlo al blastocisto de 7 días como **normales, anormales o degenerados** y **estadios intermedios o en proceso de degeneración** (5), a través de su evaluación bajo estereomicroscopio o microscopio de contraste de fase. Los blastocistos reconocidos como **normales**, son aquellos que muestran una clara diferenciación de las células trofoblásticas, del macizo celular interno y un blastocele expandido distinguible claramente. También se incluyen en este grupo aquellos blastocistos que no tienen un claro blastocele pero muestran una superficie regular de células trofoblásticas y que en el espacio perivitelino contienen únicamente 2 cuerpos polares (o 3) pero no otras células o detritus.

Aquellos blastocistos **intermedios o en proceso de degeneración** corresponden a los que muestran una morfología sin una clara diferenciación de las células trofoblásticas, el macizo celular interno y/o el blastocele. Aquellos blastocistos en los cuales la superficie del embrión presenta irregularidades y donde las células más

periféricas no mostraban buenas interrelaciones topográficas, o células o detritus celulares en el espacio perivitelo, se incluyen en este tipo.

Por último, en cuanto a los blastocistos que muestran cambios degenerativos francos, se cuentan aquellos que presentan una zona pelúcida rota o con claros signos de degeneración celular, o incluso los que presentan blastómeros separados o de diferente tamaño o un bajo número de blastómeros.

Esta metodología fue testada (5) con excelentes resultados, escaso margen de error cuando el operador está entrenado y entre los tests realizados para verificar como coherente el criterio de calificación se realizaron mediciones diametrales varias, análisis morfológicos ultraestructurales (6, 7) y cromosómicos (8), etc; al cabo de los cuales se encontró como muy significativo, la diferencia entre número de células presentes en blastocistas normales y blastocistas degeneradas de 99 a 58, contra la no significancia del espesor de zona pelúcida o el diámetro blastocitario. Se deduce pues, que en base a la simple observación de los blastocistos de días 7, tomando como criterio clasificatorio la apariencia morfológica, especialmente dirigida al número de células y al grado de su organización histoarquitectural.

De cualquier manera, este criterio de clasificación permite predecir la posibilidad de desarrollo *in vitro* pero no ofrecen una estimación cierta sobre posterior desarrollo *in vivo*. La aplicación de criterios bioquímicos tales como la captación de Glucosa, desarrollada en blastocistos de 10-11 días *in vitro*, permite una clasificación de éstos en distintos grupos, presentando diferentes posibilidades de desarrollo *in vivo*.

Siguiendo estos parámetros bioquímicos, la selección de embriones pretransferencia ha considerado otras manifestaciones de la actividad metabólica embrionaria tales como la producción del activador del plasminógeno y la actividad de las hidrolasas (9).

Por otra parte, la viabilidad de embriones bovinos congelados y descongelados puede ser evaluada con un período de incubación de 3 a 5 minutos con colorantes fluorescentes, tales como el Fluorescein-diacetilo (FDA) y el dianudino-2-fenil-indol (DAPI). Los embriones que

mueren durante el proceso de congelación no muestran fluorescencia cuando se tratan con DAPI. Por el contrario, los embriones vivos muestran una fluorescencia positiva después del tratamiento con FDA, pero son negativos después de incubación con DAPI. Usando estos métodos, es viable la rápida y exacta determinación del número de blastómeros vivas y muertas. Estos embriones con reacciones parciales a estos colorantes muestran un desarrollo no muy avanzado. El tratamiento corto con los colorantes fluorescentes no influye en el desarrollo posterior de los embriones normales (10).

REFERENCIAS

1. BOLAND, M. et al. (1978) Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology*, 10: 175-80.
2. ELSDEN, R. et al. (1978) Superovulating cows with FSH and PMSG. *Theriogenology*, 9: 17-26.
3. GREVE, T. et al. (1979) Morphological evaluation of bovine embryos recovered non-surgically from superovulated dairy cows on days 61/2 to 71/2. A field study. *A. Biol. Anim. Bloch. Biphys.* 19: 1599-1611.
4. HAMILTON, W. and LAING, J. (1946) Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. *J. Anat.* 80: 194-204.
5. LINARES, T. and KING, A. (1980) Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Theriogenology*, In Press.
6. LINARES, T. et al. (1980) The ultrastructure of blastocysts collected from virgin and repeat breeders: helpers. 9th. Int. Cong. Anim. Reprod. A.I. (Madrid) III:446.
7. LINARES, T. et al. (1980) Evaluation of morphology in 7 day old blastocyst. 9th. Int. Cong. Anim. Reprod. A. I. (Madrid) III: 448.
8. KING, W. A. et al. (1979) A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet. Sci. Commun.* 3: 51-56.
9. PHILLIPPON, A. et al. (1980) Check up of bovine embryo before transfer. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. III: 449.
10. SCHILLING, E. et al. (1980) Evaluation of deep frozen cattle embryos. 9th. Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. (Madrid) III:463.

CONGELACION DE EMBRIONES BOVINOS

En general, las técnicas han comprendido el uso de mórulas tardías y blastocistos, con la obtención de tasas de 30 a 44 % de embriones congelados que han desarrollado gestaciones posteriores.

Como medios más usados el Buffer Fosfato Dulbecco conteniendo ya sea 1.5M DimetilSulfóxido (DMSO) o 1.0M glicerol, han demostrado ser los mejores como medios de almacenamiento. La cristalización en el medio se induce automáticamente (Planner Omnifreezer R202/200R) a alrededor de -50°C con una velocidad promedio de 30°C/min, seguido por varios pasos diferentes de congelación y enfriamiento. Se sigue por un muy lento enfriamiento hasta -30 a -40°C y luego se hace

la transferencia inmediata y directa a N₂ líquido. Embriones enfriados y congelados de este modo (evitando formación de hielo intracelular) deben ser descongelados rápidamente para prevenir daño debido a crecimiento de hielo intracelular (1, 2). Siguiendo esta metodología se obtuvo el 44 % de sobrevida y éxito *in vivo* (21 gestaciones de 48 embriones congelados).

Rutinariamente, los embriones se congelan ya sea en ampollas de vidrio (1) o en pajuelas (Ministraws 3, 4) siendo las últimas una metodología más rápida y económica en muchos casos. En el momento, existen dos métodos standard (3), el método lento y el rápido (ver tabla I).

En ambos métodos, el DMSO, o el uso de glicerol al 10 % es indistinto y ha dado muy buenos resultados.

Aunque los resultados obtenidos son tanto mejores cuanto mejores los blastocistos a congelar (morfológicamente, por ej.), las menores irregularidades en morfología, como la reducción en número de células de la masa embrionaria, o falla de algunas células para participar en la compactación no han sido problema grave en la manutención de la viabilidad post congelación/reviviscencia, pero sólo en casos de mórulas tardías. En la medida que nos adelantamos más en el desarrollo (blastocistos y blastocistos elongados) la supervivencia es cada vez menor, probablemente debido a la mayor masa líquida en la cavidad blastular y a la mayor especialización celular embrionaria.