

Manipulación de Embriones

Héctor Palomino*

A nivel mundial se realizan numerosos trabajos encaminados a manipular las estructuras genéticas de la forma deseada, lo que se aparta de los esquemas de selección y mejora hasta ahora utilizados.

La mayoría de estos procedimientos requieren en cierta medida la intervención microquirúrgica de los embriones en sus estadios más tempranos de desarrollo. Las técnicas de manipulación más corrientemente aplicadas a los embriones incluye el remover células del mismo para trasplantarlos dentro de zonas pelúcidas o embriones, biopsias, dividir en mitades, inyección de núcleos, citoplasma, moléculas, remover materiales o estructuras, como pronúcleos de embriones.

Los trabajos de micromanipulación han permitido conocer con exactitud las diferentes estructuras celulares y su importancia funcional. Asimismo los estudios de desarrollo en los cuales resulta más factible practicar la intervención sobre los embriones.

CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS

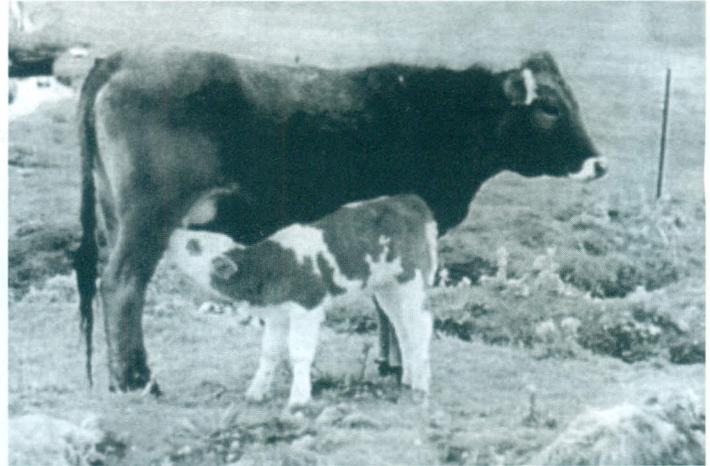
La congelación de embriones tiene por objeto detener el estadio de desarrollo de éstos sin que se afecte su viabilidad. Este método permite conservar los embriones por tiempo indefinido y posteriormente, una vez descongelados, trasplantarlos a hembras receptoras sincronizadas perfectamente, para continuar su desarrollo normal de gestación hasta el parto.

Gracias a esta práctica de conservar por largo tiempo los embriones mediante congelación profunda, se ha logrado una considerable flexibilidad en los dispositivos de sus aplicaciones prácticas. Entre las que destaca, que los costos de transporte para la importación de genotipos altamente valiosos se reduzca significativamente, lo cual sitúa al embrión congelado como la vía más económica, rápida, confiable y pragmática para mejorar en forma masiva y pronta la calidad productiva de nuestros rebaños, empleando embriones de razas o linajes deseados.^{1,2}

EMBRIONES CONGELADOS SON EL FUTURO GANADERO DEL PERÚ

Sin duda alguna, la importación de embriones congelados para su trasplante en hembras nativas ofrece notables posibilidades eficaces y económicas para introducir razas comercialmente ventajosas por su alto potencial genético en ambientes tan difíciles como la Amazonía y los Andes Altos. Con el implante de aquellos embriones en el útero de receptoras nativas –de escaso valor genético pero adaptadas a la Selva y Sierra Alta– los riesgos relacionados con la adaptación ambiental se verán reducidos y la mayor parte de la prole valiosa resultante no sufrirá los serios problemas de salud y de baja producción. De ese modo, las crías nacerán con la pureza genética de los padres biológicos y la rusticidad corporal y capacidad ambiental de sus madres nodrizas.

* Médico Veterinario, Presidente del Instituto de Reproducción y Biotecnología Pecuaria (I.R. Biotec-Pecuaria)



El empleo de este material de alta calidad genética reviste un especial interés en las etapas iniciales de los programas de mejoramiento del ganado vacuno criollo o nativo del Perú y que, sin lugar a dudas se convertirá en un sistema eficaz para acelerar los procesos de selección y mejora genética de la masa ganadera.

Este gran impacto, que está revolucionando la producción pecuaria, no solamente se debe a que hay un gran ahorro de tiempo en cuanto a la obtención de descendencia numerosa y de gran valor genético en la primera generación (F₁) –lo que se tarda muchos años en lograr con los programas convencionales de inseminación artificial– sino que, además, se aprovecha ventajosamente la larga y costosa labor de investigación que se llevó a cabo en aquellas naciones desarrolladas en el perfeccionamiento de reproductores –hembras y machos– que son los padres biológicos de aquellos excelentes embriones importados congelados.

PROCEDIMIENTO DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES

El nacimiento del primer becerro en 1973, como producto del trasplante de un embrión congelado-descongelado demostró que los embriones bovinos sobreviven al congelado, al almacenado en nitrógeno líquido y descongelado³. Desde este primer trabajo realizado, muchos progresos vienen siendo efectuados para simplificar y perfeccionar las varias etapas del proceso de ultracongelación. Actualmente existen programas computarizados para la graduación paulatina de enfriamiento y congelamiento⁴.

CRIOPROTECTORES

La mayoría de las células se pueden congelar solamente mediante la presencia de sustancias que las proteja del daño celular durante el proceso de enfriamiento y congelación, denominadas crioprotectores. Desde que se demostró el efec-

to protector al espermatozoide de la glicerina o glicerol durante la congelación, una gran variedad de estos compuestos han sido descubiertos con similares propiedades.^{5,6} Estas sustancias crioprotectoras se clasifican de acuerdo a su permeabilidad a la membrana celular, en: intracelulares (glicerol, dimetilsulfóxido o DMSO, propanediol, etilén-glicol) entre las extracelulares (sucrosa, polímeros, albúmina y otros azúcares).

El objetivo de la criobiología, es de enfriar las células lo suficiente como para permitir su almacenamiento a largo plazo sin causar daño por congelamiento. Las células contienen agua, la formación del hielo intracelular provoca daño y muerte celular. Los factores críticos son la velocidad de enfriamiento y la permeabilidad de la célula al agua. Por esa razón, este daño se debe a dos fenómenos diferentes: uno que predomina velocidad de enfriamiento rápido, en el que el problema mayor es la formación de cristales de hielo intracelular, es decir, el enfriamiento rápido no deja tiempo para la deshidratación celular, y daña a la célula al formar hielo en su interior. En cambio en la velocidad de enfriamiento lento, si bien aumenta la deshidratación celular, expone a la célula a la agresión por concentración del soluto. Por esta razón, los crioprotectores se comportarían como amortiguadores no electrolitos de bajo peso molecular que alteran las acciones de elevadas concentraciones moleculares de las células deshidratadas.

Las sustancias crioprotectoras más usadas son el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y últimamente el etilén-glicol, ellos tienen propiedades hidrófilas e hidrofóbicas que penetran lentamente en la célula a una temperatura de 0 °C por difusión libre, donde alcanzan su equilibrio químico y la acción de protección en el congelamiento; es decir, la diferenciación osmótica. Como consecuencia de la hiperosmolaridad del medio extracelular y de la alta permeabilidad de la sustancia líquida del embrión, comienzan las células debido a la pérdida de agua a engorarse y arrugarse.

La pérdida de volumen de estas células continúa hasta que se haya equilibrado la salida de agua y la entrada de glicerina a la célula.^{7,8}

MÉTODOS DE CONGELACIÓN

Desde algunos años se han propuesto diversos programas de congelación de embriones, ellos tratan de reducir el tiempo mínimo de congelación y simplificar las operaciones de manipulación y el uso de biocongeladores programables que en la etapa crítica de la curva de enfriamiento antes que las pajuelas pasen al nitrógeno líquido. Por lo que hoy podemos considerar que ello es posible si respetamos varios criterios, los cuales nos permiten obtener tasas de congelación muy aceptables.

De una forma general, en la actualidad se utiliza el siguiente procedimiento:

Las pajillas que contienen los embriones son colocadas en el biocongelador programable, que partiendo de una temperatura ambiental de +20 °C pasa hasta -5 °C o -7 °C a una velocidad del orden de 1 °C a 5 °C/minuto; donde es inducida la formación de cristales de hielo ("seeding"). Una vez formados los cristales de hielo en su parte superior de la pajilla, el proceso continúa más allá del espacio de aire entre el embrión. La temperatura alrededor de -7 °C se mantiene durante 3 - 7 minutos hasta alcanzar su equilibrio. Posteriormente la

temperatura es descendida hasta -30 °C o -35 °C a una velocidad de 0,2 °C a 0,3 °C/minuto. Cuando se llega a esa temperatura las pajuelas se sumergen rápidamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento.^{9,10}

LA PAJILLA O PAJUELA FRANCESA

Las pajillas o pajuelas (pillettes o straws), son tubitos preparados especialmente para envasar semen o embriones. Están hechas de cloruro de polivinílico, perfectamente adaptadas a las impresiones topográficas. Pueden ser de:

- Pajuela de 1,20 ml de capacidad, con un diámetro de 4,2 mm.
- Pajuela de 0,50 ml de capacidad, con un diámetro de 2,8 mm.
- Pajuela de 0,25 ml de capacidad, con un diámetro de 2,0 mm.

Las pajuelas ofrecen las siguientes ventajas:

- Absoluta seguridad sanitaria, impidiendo todo riesgo de contaminación de una dosis a otra.
- Perfecta identificación en todas las dosis.
- De fácil y seguro almacenamiento.
- Alta productividad con elevadas cadencias de trabajo gracias a un equipamiento de laboratorio automático y cada vez más sofisticado.
- Adecuado a toda modalidad de transporte y a todas las latitudes.
- Almacenamiento máximo de dosis en el mínimo de espacio.
- Alto porcentaje de fertilidad.

Un extremo de la pajuela es cerrada con polvo de alcohol polivinílico, mantenido en su lugar por estar sujeto entre dos tapones de algodón. El polvo, se polimeriza una vez que entre en contacto con un líquido y forme un gel, el cual protege absolutamente al embrión y a su medio de cualquier clase de impureza o de toda clase de contaminación.

Esterilización. Las pajuelas son colocadas verticalmente dentro de una cámara con la extremidad cerrada hacia abajo para permitir que los rayos ultravioletas penetren en el interior de la pajuela, el tiempo para la esterilización es de una hora.

PROTOCOLO PARA CONGELAR EMBRIONES BOVINOS

La técnica de congelación y descongelación utilizada fue la descrita por nosotros.¹¹ Inmediatamente después del 7 u 8 día de finalizado el cultivo *in vitro* de embriones, fueron sometidos a varios lavados en una solución estéril de Dulbecco Fosfato Salino Bufferado (PBS), más 20% de Suero Fetal Bovino (SFB). Para luego, ser mantenido en cultivo, en PBS a 37 °C hasta cuando se inicie la congelación. Sólo los clasificados en calidad y desarrollo de mórulas, blastocistos precoces o blastocistos, se utilizan para congelar.

El procedimiento consiste en una exposición gradual de los embriones a la sustancia crioprotectora mediante dos baños:

El primer baño contiene PBS más 10 % de SFB y 5 % de glicerol y dura 5 minutos.

El segundo baño contiene PBS más 10 % de SFB y 10 % de glicerina y dura 10 minutos.

Luego de pasado el tiempo del 2° baño, los embriones en forma especial son individualmente envasados en pajillas de

0,25 ml de capacidad. Para esto se conecta la pajuela, mediante un tubo de jebes, a una jeringuilla y se procede en la siguiente forma:

Llenar un tercio de la pajilla con una columna de medio (PBS + 10 % SFB + 10 % glicerol), luego una burbuja de aire, otra columna de medio que contiene el embrión, otra burbuja de aire y finalmente se completa con medio. De esa forma la 1ª columna absorbida llega al tapón de la pajuela por lo cual se solidificará al contacto con el líquido por ser algodón y alcohol polivinílico, de esa manera se hará impermeable. Esta forma de llenar la pajilla evita que el embrión se adhiera a los extremos de la pajuela y pueda ser eliminado al cortar la pajilla o pegado al tapón.

Cierre de la pajuela. Este cierre de la pajilla se realiza con un tapón de plástico que a su vez sirve para colocar la identificación.

En esa forma los embriones fueron colocados dentro de un biocongelador programable que trabaja con alcohol metílico, mediante el cual procedimos con tres rampas de descenso de temperatura.

1º Enfriamiento a una velocidad de 1 °C/minuto, desde la temperatura ambiente hasta -6 °C o -7 °C.

2º A esa temperatura, es inducido la formación de cristales de hielo ("seeding") en el medio mediante contacto local en las paredes de la pajuela con una pinza previamente enfriada en nitrógeno líquido.

Verificada la cristalización, el descenso de la temperatura continúa, esta vez a una velocidad de 0,3 °C/minuto desde -7 °C hasta alcanzar -36 °C, temperatura en la que se termina la programación en el biocongelador.

Las pajillas con el embrión se sumergen rápidamente en el nitrógeno líquido, bajando la temperatura de -36 °C a -196 °C en forma brusca, para su almacenamiento.

MÉTODO DE UNA SOLA ETAPA DE DILUCIÓN PARA EL TRANSPLANTE DIRECTO

La capacidad de los embriones obtenidos *in vitro* o *in vivo* para ser viables y culminar en un ternero vivo, es muy importante a nivel de la producción comercial.

Los métodos de congelación convencionales requieren la remoción del crioprotector en etapas y tiene sus inconvenientes en la actividad de campo debido a que el embrión es manipulado y expuesto. Se desarrolló un método en una sola etapa en la cual el glicerol se remueve del embrión dentro de la propia pajuela que también tiene columnas de medio Dulbecco Fosfato Salino Bufferado (PBS) más 20 % de suero fetal bovino, donde se unen las columnas previamente al transplante en forma directa, que permita el transplante directo, sin necesidad de extraer el crioprotector ni visualización del embrión.^{12,13}

Con el fin de hacer más eficiente y sobre todo simple y práctico el transplante de embriones, han sido reportados varios métodos de implante directo, con embriones bovinos congelados-descongelados. El método de transplante directo es muy simple y permite evitar errores debido a que el embrión es manipulado y expuesto. Lo importante es evitar el daño osmótico para lo cual es necesario utilizar un crioprotector muy permeable como es el caso del etilén-glicol, que

se difundirá rápidamente hacia fuera cuando se coloca el embrión en medio isotónico o en el útero de la receptora.¹⁴⁻¹⁶

Los embriones congelados con el crioprotector etilén-glicol y transplantados directamente, sin sacar al embrión de su pajuela original, supone un ahorro de tiempo y material muy importante por lo que este método se está imponiendo en todo el mundo, ya que además puede ser realizado por cualquier técnico de inseminación artificial, esto es sin necesidad de adquirir el largo y costoso entrenamiento necesario para la manipulación de embriones en el laboratorio.¹⁷ Alguna deficiencia en este método en comparación con los otros métodos, sería la no visualización de algún daño en el embrión en el momento de la congelación-descongelación, y por lo tanto se le considera degenerado no transplantable.

Literatura Citada

1. Bedirian,KN; Mills,MS; Bligh,TP; Geroldi,R and Kilmer,BA. Commercial export of bovine embryos from Canada to Europe. *Theriogenology* 1:3-5, 1979.
2. Nelson,RE. Proc. 7th IETS Owners managers workshop. Denver. pp. 31-42, 1981.
3. Wilmut, I and Rowson,LEA. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 92:686-690, 1973.
4. Niemann,H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124, 1991.
5. Polge,C. The storage of bull semen at low temperatures. *Vet Rec* 65:557-559, 1953.
6. Hernandez-Ledezma,JJ and Wright,RW. Deep freezing of mouse one-cell embryos and oocytes using different cryoprotectants. *Theriogenology* 32:735-743, 1989.
7. Schneider,U and Mazur,P. Osmotic consequence of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21:68-79, 1984.
8. Bouyssou,B and Chupin,D. Two-step freezing of cattle blastocysts with DMSO o glycerol. *Theriogenology* 17:159-166, 1982.
9. García,MA; Fahign,ML and Graham,EF. In vitro culture freezing thawing and transfer of bovine embryos versus transfer of fresh embryos from the same collection: Preliminary results. *Theriogenology* 26:803-812, 1986.
10. Wright,JM. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology* 23:17-30, 1985.
11. Palomino,H; Li,O; Clavo,N y Medina,E. Congelación y descongelación de embriones bovinos en el trópico peruano. *Archivos de Reproducción Animal*. Madrid-España. 7:28-33, 1998.
12. Leibo,SP. A one step method for direct non-surgical transfer of frozen thawed bovine embryos, *Theriogenology* 21:767-790, 1984.
13. Leibo,SP. Commercial production of pregnancies from one step diluted frozen thawed bovine embryos. 1986.
14. Massip,A; Van der Zwalmem,P and Ectors,F. Recent progress in cryopreservation on cattle embryo. *Theriogenology* 25:69-79, 1987.
15. Voelkel,SA and Ho,YX. Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37:23-37, 1992.
16. Douchi,D; Imai,K and Takakura,H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction* 38:179-185, 1995.
17. Nibartm and Humblot,P. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology* 47:371, 1997.