

UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI

**Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales
"CAREN"**



**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

TEMA:

**"EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES BOVINOS
(Bos Taurus) POR DOS METODOS DE DESCENSO DE TEMPERATURA EN EL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA
DE COTOPAXI"**

POSTULANTES:

**MYRIAM VERÓNICA GARCÍA GALLARDO.
LUIS FERNANDO MONTENEGRO TROYA.**

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Cristian Arcos.

Latacunga – Cotopaxi – Ecuador

2014

CARTA DE APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

En mi calidad de director de tesis titulada "EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES BOVINOS (Bos Taurus) POR DOS METODOS DE DESCENSO DE TEMPERATURA EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI" Propuesto por los egresados Myriam Verónica García Gallardo y Luis Fernando Montenegro Troya, como requisito previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Particular que pongo en su conocimiento para los fines legales pertinentes.

Atentamente,

Dr. Cristian Arcos.

Director de Tesis

CARTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TESIS

En calidad de miembros del tribunal de grado aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y CAREN por cuanto, los postulantes con el tema de tesis "EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES BOVINOS (Bos Taurus) POR DOS METODOS DE DESCENSO DE TEMPERATURA EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI", ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de defensa de tesis.

Por lo antes expuesto se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

.....

Dra. Mercedes Toro.

Presidente del tribunal.

.....

Dra. Paola Lascano.

Miembro del tribunal.

.....

Dra. Nancy Cueva

Opositora del tribunal

AUTORÍA

Yo, Myriam Verónica García Gallardo, declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de mi autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido con la ley de propiedad intelectual, por su reglamentó y por la normativa institucional vigente.

Egda. Myriam Verónica García Gallardo

AUTORA

AUTORÍA

Yo, Luis Fernando Montenegro Troya, declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de mi autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido con la ley de propiedad intelectual, por su reglamentó y por la normativa institucional vigente.

Egdo. Luis Fernando Montenegro Troya

AUTOR

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme permitido vivir hasta este día, haberme guiado y acompañado a lo largo de mi vida y de mi carrera, por ser mi apoyo, mi luz y mi camino.

Agradezco la confianza y el apoyo brindado por parte de mis padres, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me han demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos. Por darme la oportunidad de estudiar. Por ser ejemplo de vida. Gracias por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí.

A mí querida universidad que me recibió para hacer de mí una profesional, a mis profesores, en especial al Dr. Cristian Arcos y la Dra. Paola Lascano por ser parte de mi tesis.

A mis amigos Luis y Jr. por todos los momentos que pasamos y vivimos. Por las tareas que juntos realizamos y por todas las veces que a mí me explicaron gracias. Por la confianza que en mí depositaron y por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

A Luis Montenegro por haber sido un excelente compañero de tesis y amigo, por haberme tenido la paciencia necesaria y por motivarme a seguir adelante.

Finalmente a la Dra. Mercedes Toro por sus valiosas aportaciones ya que estas hicieron posible esta tesis y por la gran calidad humana que me ha demostrado con su amistad.

Gracias a todos los que me brindaron su cariño y apoyo en este trabajo, Los quiero.

Verónica García.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen Santísima por haberme dado la oportunidad de cumplir esta meta.

A mis padres, Luis Ernesto y Magdalena, porque nunca me abandonaron en este largo camino a pesar de mis caídas.

A mi hermana Andrea Carolina por todo su apoyo incondicional.

A mi hijo Mateo Sebastián por ser ese motor en mi vida, la luz de mi camino y mi razón de existir.

A los profesionales que hicieron posible este trabajo, Dra. Paola Lascano, Dra. Nancy Cueva y Dr. Cristian Arcos. En especial a la Dra. Mercedes Toro por su inmenso apoyo y por su amistad.

A mis amigos, en especial a Bruno Cuenca, por esa amistad desinteresada y porque nunca perdiste la fé, a pesar que me contaste los mundiales.

Verito García, gracias por todo tu apoyo y paciencia. Sin ti este sueño no fuera realidad.

Luis Montenegro.

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas y seres vivos, el que me dio el privilegio de estar aquí, y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, primeramente mi trabajo a Dios.

Con mucho cariño a mi Mami que ha sabido formarme con buenos sentimientos, por ser la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de vida, lo cual me ha ayudado a salir adelante y a ser una buena hija, hermana y mujer.

A mi Papi quien fue mi inspiración para seguir esta hermosa carrera; ya que por el viví siempre rodeada de esos seres mágicos que nos alegran la vida los animales. Porque tenemos los mismos sueños, Yo te dedico con todo mi corazón mi tesis.

A mi hermano Beto que siempre ha estado junto a mí brindándome su cariño sus ocurrencias y alegría; como tu hermana mayor siempre seré tu ejemplo a seguir con esta tesis te demuestro que cuando uno se quiere se puede y aún más cuando es algo que amas con el corazón.

A mis abuelitos Enma Bravo y Alberto García dos ángeles que siguen siendo parte de mi vida porque sé que sus almas están conmigo cuidándome.

A dos amigos Luis Montenegro y Héctor Llumigusin que gracias a su apoyo, y conocimientos hicieron de esta experiencia una de las más especiales para mí.

Luis, muchas gracias por estos años de conocernos y en los cuales hemos compartido tantas cosas, que ahora estás conmigo en este día tan importante para mí. Solo quiero decirte gracias.

Verónica García

DEDICATORIA

A Papá Dios y la Virgen Santísima por darme la vida para disfrutar de este momento tan especial.

A mis padres en especial a mi papá Luis Ernesto, se de la felicidad que significa esta meta en su vida.

A mi hermana Andrea Carolina.

Especialmente a mi hijo Mateo Sebastián, por toda la inspiración que significas en mi vida, y he aquí el ejemplo que te doy, no descansas jamás hasta cumplir tus sueños.

A mis abuelos Monfilio y Alejandro, porque siempre me quisieron ver profesional, desde el cielo sé que comparten mi felicidad. Como los extraño.

A mi angelito, que desde el cielo me acompaña cada día, este trabajo es principalmente para ti. Siempre te recordaré.

A ti Verito García, por toda tu dedicación, esfuerzo y por ese corazón bueno que tienes.

Luis Montenegro.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

.....
Myriam Verónica García Gallardo.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

.....
Luis Fernando Montenegro Troya.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Paginas
PORTADA.....	i
CARTA DE APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
CARTA DE APROBACION DEL TRIBUNAL DE TESIS.....	iii
CERTIFICACION DEL SUMMARY.....	iii
AUTORIA.....	iv
AUTORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
DECLARACION EXPRESA.....	x
DECLARACION EXPRESA.....	xi
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	xxii
INTRODUCCION.....	xxiv

CAPITULO I

1. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	1
1.1. ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA VACA.....	1
1.1.2. La vulva.....	2
1.1.3. La vagina.....	3
1.1.4. El cérvix.....	4

1.1.5. El útero.....	5
1.1.6. Los oviductos.....	7
1.1.7. Los ovarios.....	8
1.2. EL CICLO ESTRAL.....	9
1.3. FOLICULOGENESIS.....	12
1.4. OVOGENESIS.....	14
1.5. ANTECEDENTES DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....	15
1.6. MORFOLOGIA DE UN EMBRION.....	16
1.7. LA CRIOCONSERVACIÓN.....	21
1.7.1. Etapas del proceso de crioconservación.....	22
1.7.2. Efecto del descenso térmico sobre las estructuras celulares.....	23
1.7.3. Crioprotectores.....	24
1.7.4. Técnicas de crioconservación de embriones.....	25
1.8. SELECCIÓN DE VACAS.....	31
1.8.1. Selección de Donadoras.....	31
1.8.2. Selección de Receptoras.....	32
1.8.3. Protocolo de superovulación con folltropin.....	32
1.8.4. Recolecciones de embriones transcervical.....	34
1.9. CALIFICACION DE EMBRIONES.....	37

1.9.1. Calificación según la Madurez del Embrion.....	37
1.9.2. Calificación de Embriones según la Calidad.....	39
1.9.3. Crioconservación de embriones (etilenglicol).....	41

CAPITULO II

2.1. MATERIALES Y METODOS.....	42
2.1.1. UBICACION DEL ENSAYO.....	42
2.1.2. Datos Generales.....	42
2.1.3. Coordenadas cuadrícula mercator utm.....	42
2.2. MATERIALES.....	44
2.2.1. Animales.....	44
2.2.2. Materiales para el lavado de Embriones.....	44
2.2.3. Otros materiales.....	45
2.3. METODOS Y TECNICAS.....	45
2.3.1. Diseño Metodológico.....	45
2.3.1.1. Tipos de Investigación.....	45
2.3.1.1.1. Investigación Experimental.....	45
2.3.1.1.2. Investigación Descriptiva.....	46
2.3.1.2. Metodología.....	46
2.3.1.2.1. Metodo Inductivo.....	46

2.3.1.2.2. Metodo Deductivo.....	46
2.3.1.3. Unidad Experimental.....	47
2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	47
2.4.1. Descripción de los Tratamientos.....	47
2.5. MANEJO DE VARIABLES.....	48
2.6. MANEJO DEL ENSAYO.....	48
2.6.1. Distribución del Ensayo.....	48
2.6.2. Selección de Vacas Donadoras.....	49
2.6.3. Aplicación del Protocolo de Superovulación.....	49
2.6.4. Lavado de Embriones.....	49
2.6.5. Calificación de Embriones.....	49
2.6.6. Crioconservación de Embriones.....	50
2.6.7. Aplicación de Tratamientos.....	51

CAPITULO III

3. ANALISIS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	52
3.1. Prueba del t' student.....	57
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	61

ANEXOS.....	68
-------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Aparato reproductor de la vaca.....	1
Figura 2. Oviductos.....	8
Figura 3. Anatomía del ovario.....	8
Figura 4. Signos de celo o calor.....	11
Figura 5. Foliculogenesis.....	12
Figura 6. Desarrollo de un folículo ovárico.....	13
Figura 7. Ovogenesis.....	14
Figura 8. Desarrollo de un embrión en el transcurso del oviducto.....	17
Figura 9. Mórula compacta	18
Figura10. Blastocisto temprano.....	19
Figura 11. Blastocisto.....	19
Figura 12. Blastocisto expandido.....	20
Figura 13. Blastocisto protruido.....	21
Figura 14. Esquema de las diferentes técnicas de crioconservación.....	25
Figura 15. Pasos de la vitrificación de un embrión bovino.....	31
Figura 16. Protocolo de folltropin.....	34
Figura 17. Representación transcervical de embriones.....	36
Figura 18. Diagrama de la técnica no quirúrgica de embriones	36
Figura 19. Cronología del desarrollo embrionario.....	38

Figura 20. Transformación del ovulo fertilizado a blastocisto.....	40
--	----

CAPITULO II

Figura 21. Mapa de ubicación del CEYPSA.....	43
--	----

Figura 22. Protocolo de folltropin.....	49
---	----

Figura 23. Esquema de una pajuela plástica para cargar embriones.....	50
---	----

INDICE DE IMÁGENES

CAPITULO I

Imagen 1. Aparato reproductor de la vaca.....	2
---	---

Imagen 2. Vulva de la vaca.....	3
---------------------------------	---

Imagen 3. Vagina, uretra, vestíbulo.....	4
--	---

Imagen 4. Fénix.....	4
----------------------	---

Imagen 5. Anillos del cérvix.....	5
-----------------------------------	---

Imagen 6. Carúnculas.....	6
---------------------------	---

Imagen 7. Cotiledones.....	6
----------------------------	---

Imagen 8. Útero.....	7
----------------------	---

Imagen 9. Oviductos.....	7
--------------------------	---

Imagen 10. Ovarios.....	9
-------------------------	---

ANEXOS

Imagen 11. Selección de las vacas donadoras.....	72
--	----

Imagen 12. Chequeo a las vacas donadoras.....	72
---	----

Imagen 13. Aplicación del tratamiento.....	73
--	----

Imagen 14. Recolección de los embriones.....	73
--	----

Imagen 15. Observación de los embriones.....	74
--	----

Imagen 16. Observación y calificación de los embriones.....	74
Imagen 17. Observación y calificación de los embriones.....	75
Imagen 18. Embriones recolectados y mórulas compactas.....	75
Imagen 19. Mórulas compactas.....	76
Imagen 20. Mórulas compactas	76
Imagen 21. Mórulas compactas, tempranas, Blastocisto temprano y expandido....	77
Imagen 22. Máquina congeladora de embriones.....	77
Imagen 23. Crioconservación de embriones.....	78
Imagen 24. Extracción de las pajuelas.....	78
Imagen 25. Verificación de los embriones crioconservados pos descongelación...	79
Imagen 26. Final del ensayo.....	79

INDICE DE CUADROS

CAPITULO I

Cuadro 1. Calificación según la madurez del embrión.....	37
Cuadro 2. Calificación según la calidad del embrión.....	40

CAPITULO II

Cuadro 3. Características climáticas y edafológicas.....	43
Cuadro 4. Materiales para el lavado de embriones.....	44
Cuadro 5. Descripción de los tratamiento.....	47
Cuadro 6. Distribución del ensayo.....	48

CAPITULO III

Cuadro 7. Embriones recolectados	52
Cuadro 8. Embriones recolectados calificados según su madurez.....	53

Cuadro 9. Embriones recolectados calificados según su calidad.....	54
Cuadro 10. Viabilidad de los embriones.....	55
Cuadro 11. Prueba del t' Student.....	57

INDICE DE GRAFICOS

CAPITULO III

Grafico 1. Viabilidad de los embriones con los dos tratamientos.....	56
--	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Plantilla de superovulación.....	69
Anexo 2. Calificación de embriones.....	70
Anexo 3. Plantilla clasificación para embriones bovinos.....	71

UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI
UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES “CAREN”

Tema: “ Evaluación de la crioconservación de embriones bovinos (Bos Taurus) por dos métodos de descenso de temperatura en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi ”

Autores: García Gallardo Myriam Verónica.

Montenegro Troya Luis Fernando.

Tutor: Dr. Cristian Arcos.

RESUMEN

La crio conservación es considerada la técnica de elección para los embriones bovinos producidos in vivo. Durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intracelular o extracelular que pueden disminuir la sobrevivencia poscriopreservación. Para poder minimizar estos problemas, se recurrirá al uso de "sustancias crio protectoras", así como a tasas de descenso térmico controladas mediante la utilización de máquinas congeladoras programables de alto costo. En la actualidad ningún protocolo de congelación o vitrificación disponible garantiza la total integridad de las estructuras así preservadas. Según Dobrinsky, no importa "cómo" los embriones sean crio preservados, "siempre alguno muere".

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de los embriones post descongelados. Se utilizaron 10 embriones específicamente mórulas compactas de tipo 1; los cuales se obtuvieron de 5 vacas donadoras de raza Holstein, después de realizar el lavado de embriones se procedió a observarlos y calificar según su madurez y tipo, se aplicaron los dos tratamientos: T1, 0.3 °C por minuto (n=5); T2, 0.7 °C por minuto (n=5).

Para determinar la viabilidad de los embriones post descongelados se aplicó la siguiente fórmula:

$\% \text{ Viabilidad} = (\# \text{ de Embriones vivo} / \text{Total de embriones congelados}) \times 100.$

Restante a este resultado se determinara el porcentaje de embriones muertos y anormales.

El efecto de los tratamientos fue analizado por el método de la prueba de T' student, dando un resultado no significativo equivalente a que el T1 = T2.

De acuerdo con los resultados obtenidos con la aplicación de los dos tratamientos el T1 obtuvo el 40% de viabilidad; el T2 tuvo el 20 % viabilidad, teniendo un 30% de mortalidad y un 10% de embriones anormales. En conclusión con el T1 fue el que mayor viabilidad de embriones bovinos se pudo obtener.

UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI
UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES “CAREN”

Tema: “ Evaluación de la crioconservación de embriones bovinos (bos taurus) por dos métodos de descenso de temperatura en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi ”

Autores: García Gallardo Myriam Verónica.

Montenegro Troya Luis Fernando.

Tutor: Dr. Cristian Arcos.

ABSTRACT

Cryoconservation is considered the technique of choice for bovine embryos produced “in vivo”. During the freezing process, embryonic cells undergo significant changes associated with the formation of intra-or extracellular ice that may decrease the survival post cryoconservation. To minimize these problems, it resorts to use of "cryo protective substances"; as well as a temperature decrease rates controlled by the use of programmable freezers machines that are very expensive. Nowadays no freezing or vitrification protocol available ensures the overall integrity of the structures preserved in this way. According Dobrinsky, it is not important "as" the embryos are cryoconserved," always someone dies. "

The objective of this study was to evaluate the viability of post defrosting embryos. It used 10 embryos, specifically morulae compact type 1; which it obtained from five donors Holstein breed, after washing embryos, It proceeded to observe and qualify according to their maturity and type, two treatments were applied: T1, 0.3 ° C per minute (n = 5), T2, 0.7 ° C per minute (n = 5).

To determine the viability of post defrosting embryos the following formula was applied:

$$\% \text{ Viability} = (\# \text{ of living embryos} / \text{total embryos frozen embryos}) \times 100.$$

Remaining this result it will determine the percentage of dead and abnormal embryos.

The effect of treatments was tested by the test method T 'Student, giving an insignificant result equivalent to that T1 = T2.

According to the results obtained with the application of the two treatments T1 obtained 40% viability, the T2 had 20% viability, having a 30 % mortality and 10% of abnormal embryos. In conclusion, with T1 could be obtained most viability of bovine embryos.

INTRODUCCION

La Biotecnología en el mundo actual ha ido avanzando de a poco con los descubrimientos, nuevas investigaciones que se realizan por la necesidad de mejorar la economía ganadera.

La producción de embriones in vitro ofrece nuevas perspectivas para la aceleración del progreso genético y la utilización de bajas temperaturas para conservar esos embriones se la ha convertido en una herramienta indispensable para consolidar y aumentar el impacto de estas tecnologías.

La crio conservación y almacenamiento de embriones a bajas temperaturas presenta ventajas tanto desde el punto de vista biológico como desde el comercial.

Las posibilidades de aplicación de la tecnología in vitro son múltiples y presentan un elevado interés en el caso del ganado bovino.

La tecnología reproductiva in vitro se encuentra actualmente en un estado de desarrollo avanzado; en el Ecuador la biotecnología en la reproducción ha ido de poco dando buenos resultados en las distintas ganaderías obteniendo resultados satisfactorios para el ganadero usando hembras de alto valor genético como donadoras de embriones.

La congelación de embriones para su conservación y posterior utilización es una técnica esencial que tiene como objetivo almacenar los embriones por largos periodos de tiempo que nos permitan su posterior utilización, esta técnica nos ayuda a reducir substancialmente las dificultades logísticas de combinar la cantidad de vacas o novillas receptoras disponibles, aprovechamiento de los embriones que nos sobran de una colecta, optimización de las receptoras, simplificación de movimiento del material genético.

La crio preservación representa un desafío para las estructuras biológicas, lo cual puede generar distintos tipos de respuesta celular, ya sea a nivel estructural, ultra estructural o metabólico, determinando en muchos casos la muerte celular.

El embrión es un ser vivo en las primeras etapas de su desarrollo, desde la fecundación, hasta que el organismo adquiere las características morfológicas de la especie.

Para poder realizar esta investigación se planteó los siguientes objetivos e hipótesis:

Objetivo General

- Evaluar la crioconservación de embriones bovinos (*Bos Taurus*) por dos métodos de descenso de temperatura.

Objetivos Específicos

- Determinar la calidad de embriones para calificar los embriones crio conservables.
- Realizar el descenso de temperatura para la crioconservación de embriones calificados según el protocolo (0.3 °C por minuto y 0.7 °C por minuto).
- Verificar la calidad de los embriones crio conservados post descongelados para determinar posibles cambios en los mismos.

HIPOTESIS NULA

- **H0.-** El método de descenso de temperatura no influirá en la crio conservación de los embriones.

HIPOTESIS ALTERNATIVA

- **H1.-** El método de descenso de temperatura influirá en la crio conservación de los embriones.

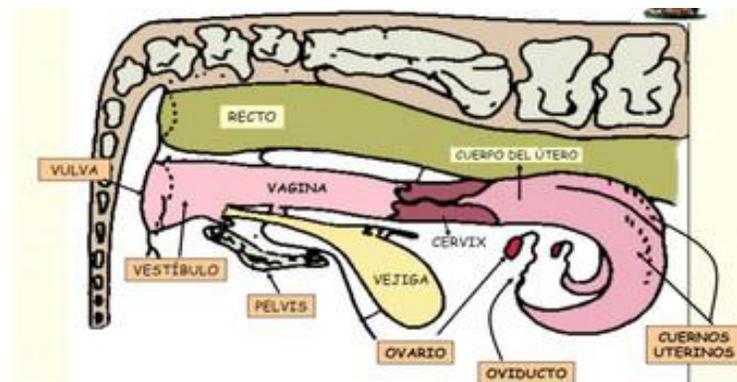
CAPITULO I

1. REVISION DE LITERATURA

1.1. Anatomía del Aparato Reproductor de la Vaca.

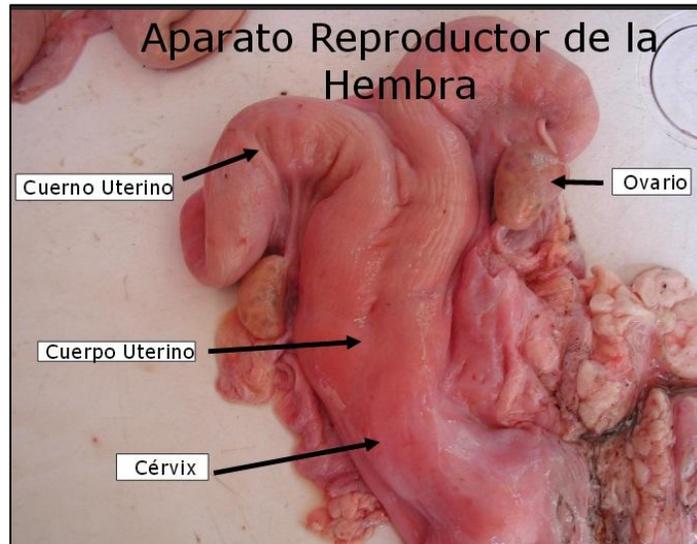
- Ovarios.(2)
- Oviductos.(2)
- Cuernos Uterinos.(2)
- Útero.
- Cérvix.
- Vagina.
- Vestíbulo.
- Vulva.

Figura 1. Aparato Reproductor de la Vaca.



Fuente: www.ganasal.com

Imagen 1. Aparato Reproductor de la Vaca.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

1.1.2. La Vulva

La vulva es la parte más extrema y está formada por los labios vulgares derecho e izquierdo, los cuales miden aproximadamente 12 cm. de longitud tienen aspecto seco y arrugado cuando la vaca no está en celo. De la vulva se encuentra el vestíbulo vaginal, el cual está en conexión directa con la vagina y el vestíbulo está marcado por el orificio uretra el cual representa el primer obstáculo a la inseminación artificial, ya que el catéter o pipeta de IA puede ser introducido en dicho orificio. En la comisura ventral de la vulva se encuentra el clítoris, el cual es el homólogo del pene. (f)

Funciones.- Dejar pasar la orina, abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto. (a) En la medida que el animal se acerque al celo, la vulva empezará a hincharse y tomará una apariencia rojiza y húmeda. (a)

Imagen 2. Vulva de la Vaca.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

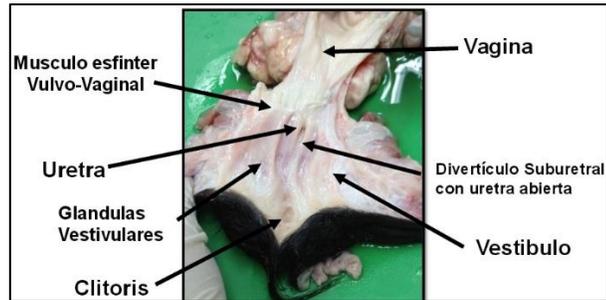
1.1.3. La Vagina

Se denomina vagina a la porción del órgano de la copula que se extiende desde el orificio externo del útero hasta la desembocadura de la uretra. (4)

Tiene como seis pulgadas de largo, se extiende desde la apertura uretral hasta el cérvix. Durante la monta natural, el semen es depositado en la porción anterior de la vagina; también sirve como parte del canal de parto. (a)

Está ubicada horizontalmente y paralela al recto, por encima de la vejiga. El tamaño de la vagina es aproximadamente de 25 centímetros y varía de una vaca a otra, dependiendo de la raza, el desarrollo corporal y el estado reproductivo de la hembra. Las paredes de la vagina son elásticas y segregan una sustancia lubricante durante el parto y en los períodos de celo o calor. La vagina está localizada dentro de la cavidad pélvica, entre la vulva y el cuello del útero. Sirve como saco de aceptación del pene del macho durante la cópula o monta. (d)

Imagen 3. Vagina Uretra y Vestíbulo.



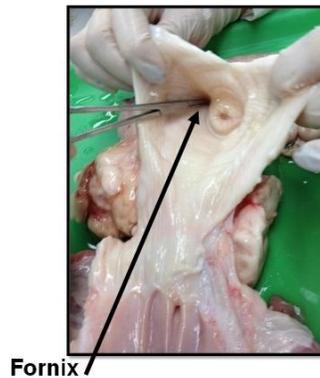
Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

1.1.4. El Cérvix

Es un órgano de paredes gruesas, que establece la conexión entre la vagina y el útero. Está compuesto de tejido conectivo denso y músculos, y será nuestra referencia al inseminar una vaca. Mide una pulgada de largo, la entrada al cérvix está proyectada hacia la vulva en forma de cono. Esto forma un círculo ciego de 360° que rodea completamente la entrada al cérvix. Esta base ciega del cono es conocida como Fénix. (a)

Imagen 4. Fénix.



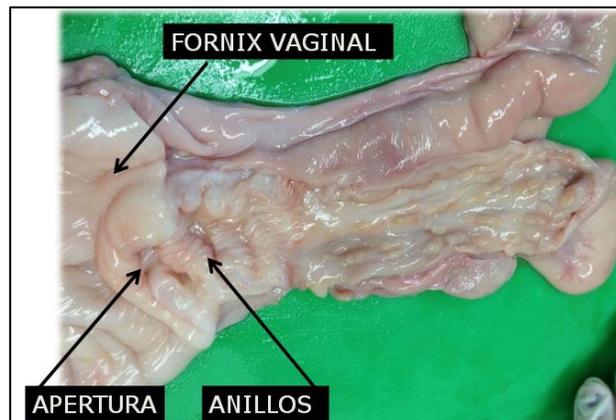
Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

La estructura más destacada son sus anillos que se encuentran apoyados sobre una potente lámina de fibras musculares lisas que permite que se contraiga o se relaje

durante el estro para permitir el paso del semen en dirección al útero o la expulsión del feto durante el parto. En la mucosa existen células secretoras de moco cervical. La cantidad y viscosidad de esta secreción depende del predominio de estrógenos o progesterona durante el ciclo estral. En la fase de estro el moco cervical es muy fluido para facilitar la ascensión de los espermatozoides, pero en cambio una vez que se ha producido la ovulación, debido a la progesterona, se transforma en una secreción muy viscosa. Por último, el número de anillos es una particularidad de cada especie, así por ejemplo, la vaca posee tres anillos. (3)

Imagen 5. Anillos del Cérvix



Fuente: Directa

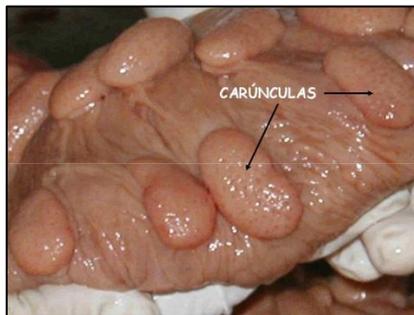
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

1.1.5. El Útero

El útero es el órgano que incuba al ternero. Este órgano tiene un cuerpo, que luego se divide en dos cuernos que conducen a los ovarios. En una vaca que no está preñada, el cuerpo uterino mide menos de 2 pulgadas (5 cm) de largo. La primera función del útero es transportar el espermatozoides hacia los cuernos uterinos para fertilizar el óvulo. La segunda, es nutrir y proteger el ternero durante la gestación. La tercera es expulsar al ternero a través de la vagina en el momento del nacimiento. (9)

En su interior está recubierto de una membrana mucosa, llamada endometrio con abundantes glándulas simples, excepto en las carúnculas que no son glandulares. Las carúnculas son proyecciones o pequeños botones de la superficie interna del útero, donde se fijan, por medio de los cotiledones, las membranas fetales durante la gestación. Las carúnculas durante la preñez aumentan su tamaño, se entrelazan con otras estructuras semejantes que se desarrollan en la placenta fetal o sea los cotiledones, a través de los cuales se alimenta el ser que comienza a formarse. (u)

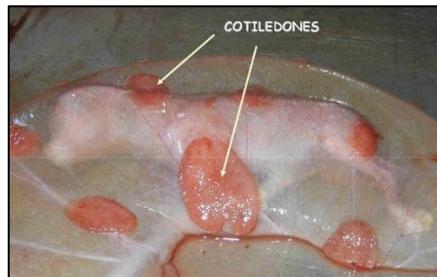
Imagen 6. Carúnculas.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 7. Cotiledones.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Cuando una hembra es servida, ya sea por monta natural o por inseminación artificial, los músculos uterinos, bajo la influencia de las hormonas Estrógeno y Oxitocina, se contraen rítmicamente para ayudar en el transporte de espermatozoides hacia el Oviducto (a)

Imagen 8. Útero.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

1.1.6. Los oviductos

Los Oviductos son también conocidos como trompas de falopio. Son conductos sinuosos que llevan el ovocito del ovario respectivo al cuerno del útero. Es el sitio donde el ovocito es fecundado por el espermatozoide. La porción del oviducto adyacente al ovario se despliega en forma de embudo (infundíbulo). El borde del infundíbulo, en forma de fleco, se llama fimbria. Las porciones siguientes del oviducto se denominan: ampolla, istmo y unión útero-tubárica. (d)

Estructuras vellosas sobre el infundíbulo y dentro del Ámpula, se mueven rítmicamente para transportar el óvulo y su masa de células cúmulus, a través del Oviducto al sitio de la fertilización. (c)

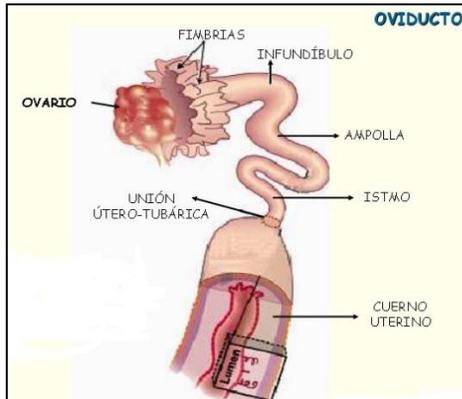
Imagen 9. Oviductos.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Figura 2. Oviductos.



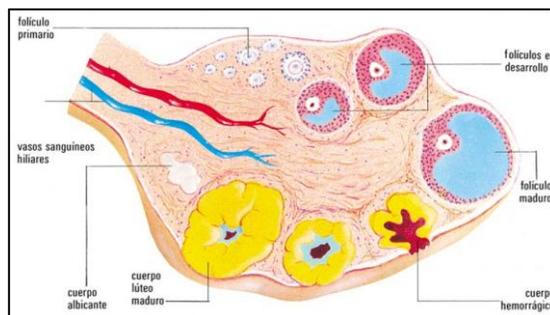
Fuente: Senger 2004.

1.1.7. Los Ovarios

Los ovarios son las estructuras más importantes y complejas del tracto reproductor de las vacas debido a que interactúa con otras glándulas y estructuras nerviosas en el cuerpo para poder controlar el ciclo reproductivo de la vaca. Los ovarios funcionan como glándulas exocrinas (producción de óvulos) y como glándulas endocrinas (producción de hormonas sexuales). (x)

Normalmente el bovino sexualmente maduro expulsa uno o en ocasiones más óvulos cada 18 a 24 días, precedido del celo o calor. Las partes anatómicas que componen el ovario son las siguientes: epitelio germinal, túnica albugínea, folículo primario, folículo maduro, cuerpo hemorrágico, cuerpo lúteo, cuerpo albicans, folículo atrésico e hilio. (b)

Figura 3. Anatomía del Ovario.



Fuente: <http://jairoserano.com>

Los ovarios están localizados en la parte superior de la cavidad abdominal más o menos a una distancia de 30 a 45 centímetros del orificio vulvar. Cada ovario mide aproximadamente de 3 a 4 centímetros de largo por 2 a 3 de ancho. Este tamaño varía según el estado reproductivo del animal, tamaño y raza de la vaca y según la función que desempeñe el ovario en el momento del ciclo estral. (a)

Imagen 10. Ovario.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

1.2. El Ciclo Estral

Con el tiempo, ocurren muchos cambios en el aparato reproductor, en respuesta a distintos niveles de hormonas. En una hembra no gestante, estos cambios ocurren cada 18 a 21 días. Esta periodicidad se llama ciclo Estral.

El ciclo estral se puede dividir en 4 etapas:

- Proestro.
- Estro.
- Metaestro.
- Diestro.

Cada una de estas etapas es una subdivisión de la fase folicular y luteal del ciclo.

La fase folicular incluye proestro y estro mientras que la fase luteal incluye metaestro y diestro.

Proestro = formación de folículos ovulatorios + secreción de estrógenos.

Estro = receptividad sexual + aumento de la secreción de estrógenos.

Metaestro = formación de CI + comienzo de secreción de progesterona.

Diestro = secreción sostenida de progesterona. (17)

Proestro:

La parte folicular del ciclo estral corresponde a la fase del proestro. Dura alrededor de 3 a 4 días, los pulsos de hipotálamo-adenohipofisarios de GnRH, LH y FSH se presentan en su frecuencia máxima y menor amplitud, el folículo y el ovario alcanzan su máximo tamaño; la hembra muestra mayor excitación sexual bajo la influencia de estrógenos. El flujo sanguíneo en el aparato reproductor aumenta, provoca un edema y secreción por el epitelio del oviducto, útero, cuello y vagina. (q)

Estro:

Un ovario tendrá un folículo grande, tal vez de 15 a 20 mm de diámetro. Este folículo contiene un ovulo maduro, listo para ovular, las células dentro del folículo están produciendo estrógenos que es transportado por la sangre a todas partes del cuerpo este hace que el útero sea más sensible a estímulos y ayuda en el transporte de espermatozoides, hace que el cérvix secrete un moco viscoso que fluye y lubrica la vagina. Los estrógenos también son responsables de los síntomas externos del celo. (9)

Metaestro:

Llamada fase periovulatoria o metaestro, comienza cuando inicia el celo. Durante esta fase se libera el pico mayor de gonadotropinas (LH) que provocan la ovulación. (r)

Se forma una cavidad o cuerpo hemorrágico en donde se distribuyen las células de la teca interna que se multiplican y se diferencian en células lúteas chicas.

Las células de la granulosa se hipertrofian junto con la amplia red de capilares que forman el cuerpo lúteo secretor de Progesterona. La producción de Estradiol disminuye. En esta etapa algunas vacas presentan sangrado metaestral. (v)

El nuevo folículo ovulado sufre remodelación celular y estructural para la formación de una glándula intraovárica llamada CL. Ésta transición celular es llamada luteinización. Durante el metaestro la progesterona secretada es detectada tempranamente después de la ovulación. Sin embargo se requiere 2 a 5 días después de la ovulación para que el CL produzca cantidades suficientes de progesterona. (5)

Diestro:

Representa la fase más larga del ciclo que corresponde a un periodo de inactividad sexual. Esta fase va desde la madurez del cuerpo amarillo o lúteo hasta su desaparición, denominado regresión. Si hay la fecundación la fase metaéstrica continua a lo largo de toda la gestación. Sino habido fecundación el cuerpo amarillo regresa pasando a convertirse un cuerpo albicans. (17)

Figura 4. Signos de celo o calor.

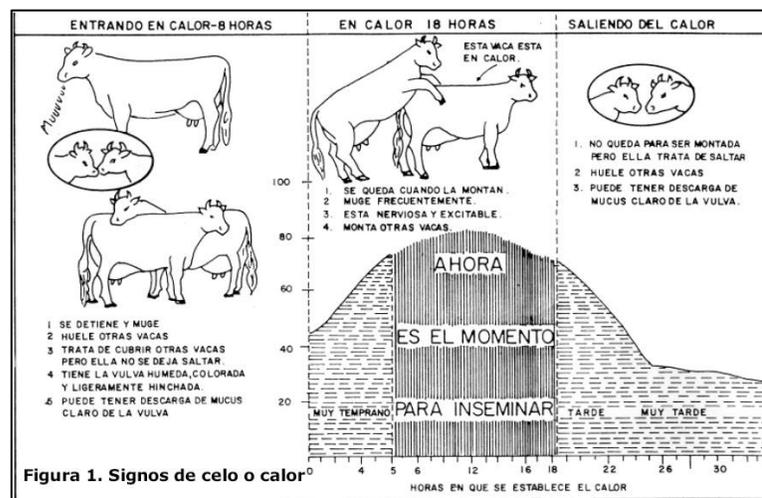


Figura 1. Signos de celo o calor

Fuente: www.webveterinaria.com

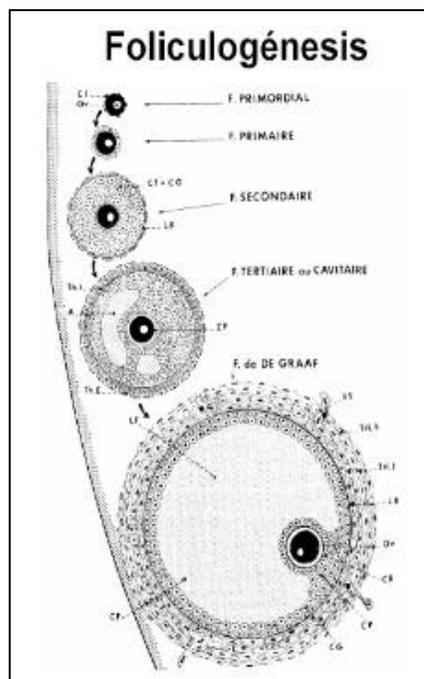
1.3. Foliculogenesis.

Permite obtener un folículo pre ovulatorio o de Graff a partir de los folículos primordiales. Estos folículos, están formados por ovocito rodeado de una capa de células foliculares planas y por mecanismos intraovarios. (4)

Los folículos ováricos son estructuras formados por un conglomerado de células granulosas que encierran a cada ovocito en el interior del ovario. Dentro de los folículos tiene lugar la ovogénesis. La foliculogénesis es la formación y maduración de los folículos ováricos, a partir del folículo primordial hasta períodos intermedios o finales. De acuerdo a la etapa de desarrollo, se distinguen distintos tipos de folículos.

(i)

Figura 5. Foliculogenesis.



Fuente: MVZ, MC ERIC B. FRAGA ESCAMILLA 2009

a) **Folículos primordiales:** Se encuentran en gran número en el ovario antes del nacimiento.

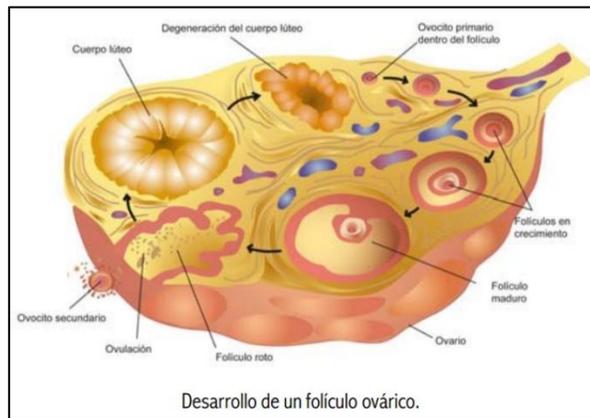
b) **Folículo primario:** El oocito se encuentra rodeado por una simple capa de células cuboidales o poliédricas.

c) **Folículo secundario.** El oocito está rodeado por varias capas de células poliédricas o cuboidales, momento en el cual, las células de la granulosa desarrollan receptores para FSH y estrógenos.

d) **Folículo terciario:** El oocito está rodeado por varias capas de células granulosas y el antro folicular está formado.

e) **Folículo de Graff:** Se forma como resultado de la acumulación de fluido folicular y hace que se extienda el antro, el oocito se ubica en la periferia del folículo y se rodea por una acumulación de células de la granulosa. Debido a su talla, el folículo de Graff maduro, emerge desde el ovario a la superficie en forma de ampolla. (5)

Figura 6. Desarrollo de un Folículo Ovárico.



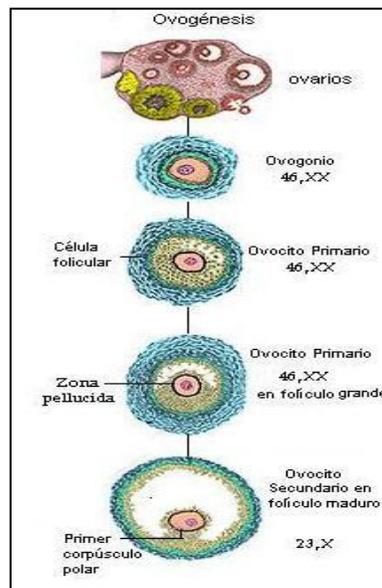
Fuente: <http://salesganasal.com>

1.4. Ovogénesis

La ovogénesis es el proceso de formación, crecimiento y maduración de los gametos femeninos. Comienza a partir de la vida fetal con la división mitótica de las ovogonias y posterior transformación en ovocitos. A partir de esta célula, comienza el proceso de meiosis que permite obtener una célula haploide capaz de ser fecundada (óvulo). (4)

Luego de comenzada la meiosis, los ovocitos son rodeados por células foliculares (células pregranulosas). Y se produce la detección de la misma en el estadio de diploteno, profase I, ovocito I. Cuando se produce el pico preovulatorio de LH, solo el ovocito contenido en el folículo preovulatorio reinicia su meiosis hasta el estadio de metafase II, ovocito II, estadio en el cual ovula y permanece así, hasta que se contacte con el espermatozoide, en el momento de la fecundación y se transforme en óvulo. (11)

Figura 7. Ovogénesis.



Fuente: saludentretodos.files.wordpress.com

1.5. Antecedentes de la Transferencia de Embriones.

La historia de la transferencia de embriones se remonta a 1890 cuando el inglés Walter

Heape, realizó con éxito la primera transferencia embrionaria en conejos. A partir de entonces se han informado transferencias embrionarias exitosas en todo tipo de animales de granja. La comercialización de tecnología para la transferencia embrionaria comenzó en América del Norte. (t)

Una hembra (donadora) puede aumentar su número de crías durante su vida al concebir de manera repetida y mediante la recuperación de embriones al inicio de la gestación y la transferencia de estos a los aparatos reproductores de otras hembras (receptoras) para completar la gestación. Este procedimiento depende por completo de la disponibilidad de una fuente de embriones de calidad adecuada y el medio uterino propicio de la receptora al momento de la transferencia embrionaria (sincronía) (Hafez, 2000).

El principal objetivo del transplante de embriones es incrementar la tasa reproductiva de una hembra de excelentes características, fecundada con un toro de alta genética (Aspron, 1992).

La transferencia embrionaria se ha aplicado muy extensamente en la vaca; en consecuencia, la tecnología ha avanzado con más rapidez en esta especie, la anestesia general y la laparotomía eran necesarias para la colección y transferencia de embriones bovinos. La utilización de embriones junto a la inseminación artificial en programas de mejora genética es una práctica que ha venido difundiéndose en forma creciente en los últimos 20 años. (Palomino *eta/.*, 1998).

La transferencia de embriones es una técnica de manipulación genética y dentro del campo de la reproducción tiene como propósito servir como herramienta en el mejoramiento genético del ganado e incrementar el potencial reproductivo de hembras sobresalientes en líneas específicas de la reproducción. La transferencia comercial de embriones en Norteamérica se desarrolló en los principios de los años setenta con la introducción de razas continentales (Betteridge, 2003).

En los últimos 30 años la aplicación de esta tecnología ha ido en aumento (especialmente en el ganado lechero), con más animales seleccionados por su genética que por un fenotipo deseable. La historia de la transferencia de embriones en el ganado bovino fue publicada por Seidel y Seidel en una publicación de la FAO en 1991. (y)

En Canadá, más del 70% de las transferencias de embriones se realizan en el ganado lechero y aproximadamente el 70% de los embriones producidos in-vivo son congelados anualmente, de los cuales 22.000 han sido exportados en el 2006 (Asociación Canadiense de Transferencia de Embriones). (e)

La mayoría de los embriones transferidos en Canadá son para aumentar la descendencia de hembras "elite "puro registradas. Este es el más importante uso de la transferencia de embriones en este país, donde de los 122 toros Holandos en el mercado para IA, 39 fueron producidos por transferencia de embriones (Datos del año 2006).

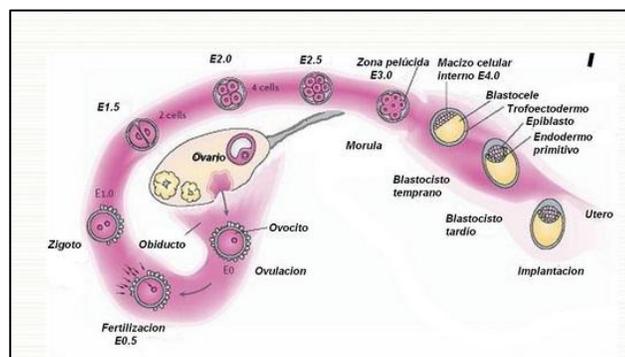
En el mundo, más de 121.000 donantes son súper ovuladas y más de 670.000 embriones transferidos (IETS, 2003). La mayoría de los embriones transferidos en el 2006, fueron congelados (53 vs. 47%), con algunas notables diferencias dependiendo de la región.

En cuanto a Europa, en el año 2007 el país con más embriones transferidos fue Francia con 28.442, mientras que España está ubicada en el número 12 con 1.257 embriones transferidos (IETS, 2003). (t)

1.6. Morfología de un Embrión.

Después de su liberación, el ovocito es "atrapado" por las fimbrias del infundibulum y dirigido al interior del oviducto a través de la actividad ciliar. El ovocito bovino, fertilizado o no, es una célula de 150-190 μ m de diámetro (Lindner y col. 1983; citado por Palma, G.A., 2001), incluyendo a la zona o membrana pelúcida, una capa acelular glicoproteína de 12 a 15 μ m de espesor producida por el ovocito (Dietl, 1986; citado por Palma, G.A., 2001). En la ampolla del oviducto la fecundación desencadena el comienzo del desarrollo previo a la nidación del embrión. Pocas horas después de la fusión nuclear el cigoto comienza a dividirse. La división nuclear es mitótica y las nuevas células se denominan blastómeros. El desarrollo del embrión hasta los 8 días ocurre dentro de la zona pelúcida. En los primeros 6 días de desarrollo no se manifiesta aumento de tamaño, sólo el incremento del número de blastómeros.

Figura 8. Desarrollo de un embrión en el transcurso del oviducto.



Fuente: www.quimicaviva.com

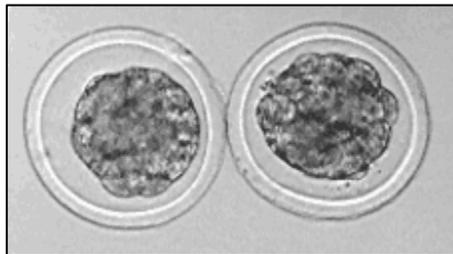
La edad del embrión es establecida a partir del día del estro (día 0). Al día 1 le corresponde la ovulación. De esta forma entre 24 y 36 h después de la fertilización el

cigoto de una célula se divide en 2 células ovales; 24 h más tarde (día 3) el embrión cuenta ya con 4 células. La división de los blastómeros puede cumplirse en forma asincrónica, razón por la cual es posible observar en estadios tempranos un número impar de células. El intervalo entre la división más temprana y la más tardía es de alrededor de 4 horas (Pedersen, 1988; citado por Palma, G.A, 2001). Hasta el estadio de 8 células (día 4) el cigoto es transportado a través del oviducto. El día 5 - aproximadamente- se produce el ingreso al cuerno uterino en estadio de 16 células, momento a partir del cual es posible obtener el embrión en forma no quirúrgica y evaluarlo de acuerdo a su estadio y calidad. Dentro del quinto día el cigoto continúa su desarrollo a 32 blastómeros y su forma es similar a la de una mora, razón por la cual se lo denomina **mórula temprana**, en la cual es posible distinguir individualmente a los blastómeros. Su masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino. (Palma, G.A, 2001).

Mórula Compacta

Según Pedersen, 1988; citado por Palma, G.A., (2001), sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60-70% del espacio perivitelino. Según Serrano, J., (2009) las blastómeras se juntan y forman una masa celular sólida. El embrión ocupa aproximadamente un 60% del espacio perivitelino.

Figura 9. Mórulas Compactas

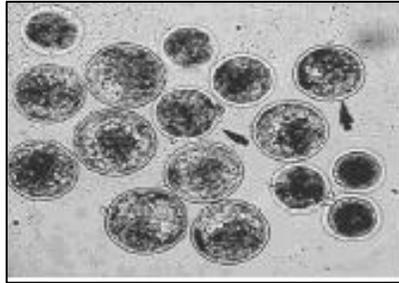


FUENTE: Palma, G., 2001

Blastocisto Temprano

Según Palma G.A., (2001), se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocele) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello. El Bt ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Según Serrano, J., (2009), presenta una cavidad en donde se encuentra un fluido llamado blastocele. El embrión ocupa el 70-80% del espacio perivitelino. Se puede diferenciar el trofoblasto y el macizo celular interno.

Figura 10. Blastocisto Temprano.

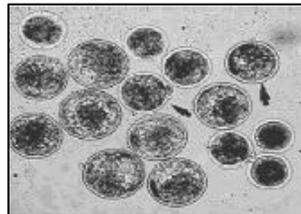


FUENTE: Palma, G., 2001.

Blastocisto

Según Palma G.A., (2001), existe una marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular interna (o disco embrionario) más oscura. Según Serrano, J., (2009), la única diferencia entre los estados de Blastocisto temprano y Blastocisto es básicamente el tamaño de la cavidad.

Figura 11. Blastocisto.

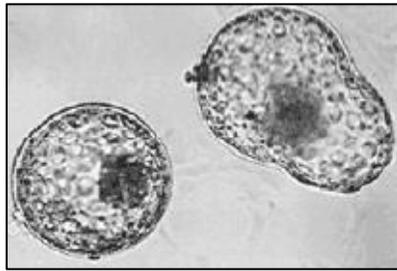


FUENTE: Palma, G., 2001.

Blastocisto Expandido

Según Palma G.A., (2001), el diámetro aumenta considerablemente (1,2 a 1,5x), con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original. La presión creciente del Blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión. Los embriones recuperados en este estadio se pueden colapsar temporalmente, esto se caracteriza por una pérdida completa o parcial del blastocele. Según Serrano, J., (2009), el diámetro aumenta hasta en un 150%. La zona pelúcida se adelgaza hasta un 66% con respecto al grosor que tenía en el Estado 4 (mórula). Estos embriones tienen una edad estimada de 8 a 9 días.

Figura 12. Blastocisto Expandido.



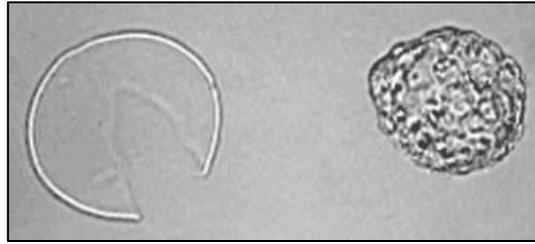
FUENTE: Palma, G., 2001.

Blastocisto Protruido

Según Palma G.A., (2001), los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido ("burbuja") o colapsado. La identificación en este estadio puede ser difícil para el operador inexperto. Los Bp pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se acostumbra a transferir estadios de Mt a Be.

Según Serrano, J., (2009), la masa celular puede estar por fuera de la zona pelúcida o en proceso de salir. Luego viene un estado llamado Blastocisto ecllosionado expandido.

Figura 13. Blastocisto Protruido.



FUENTE: Palma, G., 2001.

1.7. La Crioconservación

Gracias a los avances desarrollados a nivel mundial en el campo de la reproducción asistida, es factible obtener un incremento en el número de embriones obtenidos de una hembra donante. Con la ayuda de tratamientos hormonales superovulatorios, se logra la preñez y el nacimiento de las crías al transferirlos a receptoras sincronizadas. De esta manera, se alcanza un mayor número de descendencias a partir de un animal con excelentes cualidades, tanto productivas como genéticas. (g)

El uso de la criopreservación de embriones dentro del proceso de transferencia de embriones, brinda una herramienta de suma utilidad, ya que a través de esta técnica podemos conservar durante un prolongado período de tiempo un embrión de excelente calidad, que permite utilizarlo cuando y donde se produzcan las condiciones favorables para lograr la preñez de las receptoras, o ser usada en algún lugar lejano de donde fue colectado. Desde la primera criopreservación de embriones de mamíferos lograda con éxito en los años 70, este campo ha alcanzado grandes avances, todos dirigidos a estandarizar técnicas simples y rápidas en su ejecución, económicas, aplicables a campo y lo más importante, que ocasionan el menor daño posible al embrión. (16)

Uno de los principios más importantes de la crio preservación de embriones es poder permitir el almacenamiento de las estructuras a bajas temperaturas (-196°C), intentando mantener su integridad, a través de la remoción del máximo volumen posible de agua 16 antes de su congelamiento, evitando así la formación de hielo (Wowk, 2010; Saragusty y Arav, 2011).

Su curva de lenta de congelación permite mantener el equilibrio entre los factores que pueden causar daño celular, como son la formación de cristales de hielo, la fractura de la zona pelúcida del embrión, el daño toxico y osmótico, así como las alteraciones de las organelas intracelulares y del citoesqueleto (Dobrinsky , 2000; Vajta y Kuwayama, 2006). Durante este procedimiento, los embriones son equilibrados dentro de bajas concentraciones de crioprotectores, en pajuelas de inseminación de 0.25 ml, con tasas de refrigeración entre los 0.3 a 1 °C/min, hasta alcanzar los -30 a -35°C, para posteriormente poder ser sumergidos en el nitrógeno líquido. (Vanderzwalmen et al., 2002).

1.7.1. Etapas del Proceso de Crio conservación

Hay 4 etapas:

- a)** Suspensión de los embriones en soluciones a la que se les ha adicionado crioprotectores,
 - b)** Enfriamiento en condiciones tales que eviten la formación de cristales intracelulares cuando se sumergen en nitrógeno líquido (-196 ° C),
 - c)** Entibiamiento de los embriones a temperaturas fisiológicas para reasumir las funciones
 - d)** Remoción de los crioprotectores (dependiendo del criopreservante del que se trate)
- (13).

1.7.2. Efecto del Descenso Térmico sobre las Estructuras Celulares

- **Formación de hielo intra o extracelular:** Durante el proceso de crio preservación, la formación de hielo intracelular puede deberse a tasas de descenso térmico muy altas. Actualmente, la utilización de modernas máquinas congeladoras programables y la combinación de distintos crioprotectores, determinan que sea poco habitual la lesión embrionaria por hielo extracelular.

(f)

- **Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico.** La adición o extracción de las sustancias crioprotectoras, así como el propio proceso de congelación (efecto de solución), producen cambios de volumen en las células embrionarias que, dependiendo de su magnitud, pueden afectar su sobrevivencia poscrio-preservación. (k).
- **Efecto tóxico del crio protector.** El cito esqueleto constituye una compleja red de filamentos proteicos, extendidos a través del citoplasma, que coordinan la organización y el movimiento intracitoplásmico. (8)
- **Alteraciones de las membranas celulares.** Las membranas celulares (plasmática y de organelas) son adversamente afectadas por efecto osmótico durante los procesos de crio preservación y su lesión constituye uno de los indicadores más importantes de muerte celular. Otra causa por la cual las membranas pueden ser dañadas la constituye la formación de hielo intracelular (z).
- **Fractura embrionaria o de la zona pelúcida.** Este tipo de lesiones, probablemente se produzcan debido a diferencias en la expansión de los cristales de hielo, lo cual generaría cambios irregulares de volumen en los

medios de criopreservación durante un rápido cambio de fase. La utilización de elementos flexibles (pajuelas plásticas) para contener los embriones durante la criopreservación permite amortiguar los cambios de volumen de la solución(k)

- **Otras crioinjurias.** Durante la congelación, los embriones rara vez toman contacto directo con los cristales de hielo, permaneciendo en la fracción no congelada, donde son expuestos a diversos tipos de estrés físico, tales como:
 - a) Daño mecánico como consecuencia de la formación de burbujas debido a un aumento de gas soluble.
 - b) Alteración en los procesos de difusión y osmosis, producto de un aumento de la viscosidad.
 - c) Desnaturalización proteica, debido a cambios de pH. (8)

1.7.3. Crioprotectores

Un crio protector es un compuesto químico que permite la mantención de un tejido o de células por mucho tiempo cuando se las mantiene a baja temperatura.

Los crio protectores difieren en la velocidad para penetrar los tejidos, el grado de protección al cristal de agua que confieren y por la toxicidad química que pueden tener sobre las células. El grado de protección a las células está directamente vinculado al grado de asociación que tengan con el agua molecular. A mayor afinidad, menor el agua disponible para la cristalización dañina. Además, estos productos se utilizan en conjunto con los medios nutritivos líquidos que conforman las mezclas congelantes. (1)

En la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

- **Permeables o intracelulares:** De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma.
- **Impermeables o extracelulares:** De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sacarosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua. (m)

Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica (causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso). Además, no deben ser tóxicos a los embriones. El estado de desarrollo embrionario tiene gran incidencia en la velocidad de penetración del crioprotector. (g)

1.7.4. Técnicas de Crio conservación de Embriones

Figura 14. Esquema de las diferentes técnicas de crio conservación de embriones



Fuente: Técnicas para la Criopreservación de Embriones bovinos. Belascoain, Díaz, Hüter.

CRIOPRESERVACIÓN EN EQUILIBRIO

Deben lograr un "equilibrio" entre la tasa a la cual el agua sale de la célula (deshidratación) y la tasa a la cual ese agua es incorporada a los cristales de hielo extracelular.

La técnica Tradicional perteneciente a este tipo de criopreservación incluye las técnicas Estándar, de un paso y de Transferencia Directa de los cuales se hará una corta descripción. (1)

Tradicional

Los crioprotectores utilizados en esta técnica son normalmente permeables. Los más frecuentemente utilizados son: glicerol y etilenglicol. Este fenómeno se debe a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular y a que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores; la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del CP. A medida que el CP penetra en el embrión, éste se expande gradualmente a causa de una reentrada de agua para el mantenimiento del equilibrio osmótico. (m)

Los embriones congelados con el método tradicional con glicerol o con etilenglicol deben ser descongelados rápidamente para una óptima sobrevivencia. Un protocolo típico de descongelación incluye mantener las pajuelas durante 5 a 10 segundos en el aire (lo que evita que se rompa la zona pelúcida) y luego sumergirlas en agua a 25-37°C hasta que el hielo este completamente derretido en aproximadamente 30 segundos. La descongelación completamente al aire resulta en una reducción de la viabilidad embrionaria, mientras que la descongelación directamente en agua resulta en una alta incidencia de fracturas de la zona pelúcida. (16)

Los porcentajes de preñez son inversamente proporcionales al tiempo transcurrido desde la recolección del embrión hasta el comienzo de la congelación. La viabilidad

embrionaria disminuye significativamente cuando dicho periodo es mayor a 3 horas.
(12)

- **Estándar**

La técnica de congelación estándar posibilitó a Wilmut y Rowson (1973) obtener el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado. En la técnica de congelación estándar la exposición de los embriones al medio de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente (20 - 22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración. Este período incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas de 0.25cc. Lo que permite realizar rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o "seeding". Las pajuelas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajuelas con la del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajuela con una placa metálica o hisopo enfriado con nitrógeno líquido (NL 2); el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido, alcohol, etanol o metanol enfriado por medio de un compresor. (2)

El no inducir la cristalización conduce a la formación de cristales de hielo bajo un estado de súper enfriamiento y a una elevación repentina de temperatura (se genera calor latente de -10° - -15 ° C), resultando un severo trauma físico que puede dañar las células. (1)

Una vez efectuada la cristalización, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (período de estabilización) y luego se desciende a una velocidad de entre 0.1 y 0.5°C hasta -30 ó -35 C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, en este momento las pajuelas pueden ser retiradas del equipo de congelación y sumergidas en nitrógeno líquido. (16)

- **De un paso**

Desde el momento en que se demostró que la sacarosa podía ser utilizada para retirar el crioprotector de los embriones, surgió la posibilidad de diseñar una técnica de extracción que se adaptara al trabajo en condiciones de campo. Para evitar que durante la extracción del crioprotector el embrión esté en contacto con el medio externo, Leibo (1982) y Renard y col. (1982), implementaron el denominado método de congelación de embriones en un paso o "one-step". (f)

Este procedimiento se basa en el uso de un crioprotector no permeable, como la sacarosa, que permite la remoción de un crioprotector permeable, como el glicerol. Con esta técnica, se pueden transferir los embriones directamente a la hembra receptora sin la necesidad de una evaluación microscópica previa a la transferencia y sin el repetido shock osmótico que sufren las células cuando se usa el método en etapas. Después de la descongelación, la pajueta se agita con el fin de mezclar ambas soluciones y de esta forma el glicerol abandona el embrión como resultado del gradiente de concentración causado por la solución de sacarosa. (k)

Como la sacarosa no es permeable, el embrión se contrae a medida que el agua y el glicerol salen de las blastómeras. El embrión eventualmente se rehidrata con los fluidos del útero de la hembra receptora una vez que ha sido transferido y alcanza nuevamente su volumen osmótico. Esta técnica representa una gran ventaja práctica, dado que posibilita transferir embriones congelados de manera similar a lo que ocurre con la inseminación artificial. (l)

- **De Transferencia Directa.**

Una versión de la técnica de un paso, es la llamada técnica de transferencia directa, en el cual se emplean crioprotectores altamente permeables tales como el etilenglicol o el 1,2 propilenglicol. En tal sentido, las pajuelas son descongeladas y el embrión es

transferido directamente al útero de las receptoras. Como estos crioprotectores son altamente permeables, los embriones que son congelados y descongelados sufren un daño osmótico muy leve cuando son transferidos directamente a un ambiente ismótico (útero). (m)

Esta técnica simplifica sustancialmente el procedimiento de la transferencia embrionaria, ya que permite la transferencia de los embriones directamente al útero de las receptoras, sin extraerlos de la pajuela en la que fueron congelados. Además, reduce el tiempo requerido para realizar la técnica y disminuye los costos. En cuanto a la tasa de preñez, no difiere mucho a la obtenida con la técnica tradicional en los cuales se remueve el crioprotector antes de la transferencia. (2)

CRIOPRESERVACIÓN NO EQUILIBRADA

El término no equilibrada, se usa para describir la criopreservación por procedimientos en los cuales las células y los tejidos no están en equilibrio con las altas concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables, antes de un enfriamiento rápido. Las altas concentraciones de crioprotectores causan una rápida deshidratación de las células y el enfriamiento ocurre antes del equilibrio osmótico entre el medio y el embrión. Los procedimientos de criopreservación no equilibrada, difieren de los procedimientos equilibrados en el logro de una mayor deshidratación y penetración de los crioprotectores previo al inicio del enfriamiento, logrando este enfriamiento en un solo paso. (16)

Rápida

Esta técnica es usada para describir la criopreservación de células que han sido parcialmente deshidratadas antes de ser sometidas a una tasa de enfriamiento rápido de 1250 °C/min. Un prerrequisito fundamental para criopreservar embriones

exitosamente por este método, es usar una solución compuesta de una mezcla de 2 a 4,5 M de crioprotectores permeables, tales como el glicerol, el propanediol, el dimetilsulfóxido o el etilenglicol, y 0,25 a 0,5 M de crioprotectores no permeables tales como la sacarosa, la trehalosa, la lactosa o la galactosa (Gordon, 1994).

Después de un período de equilibrio (30 segundos a 3 minutos), los embriones en un estado parcialmente deshidratado son enfriados en temperaturas intermedias de -21°C durante 35 minutos antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido. En contraste con la vitrificación, el agua extracelular se congela y la osmolaridad de la solución de congelación aumenta, causando mayor pérdida de agua desde las blastómeras del embrión. (8)

Vitrificación

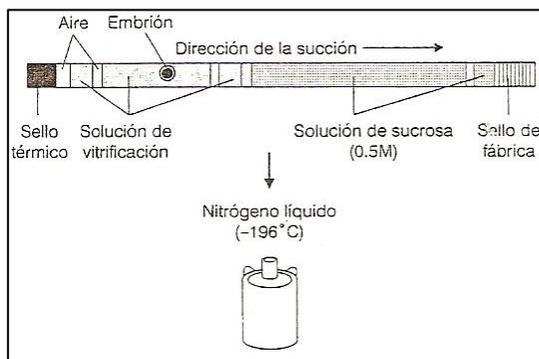
La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en NL no requiere más de 10 minutos. En condiciones prácticas, la vitrificación se logra mediante la inmersión directa en NL. Esto representa una velocidad de enfriamiento de aproximadamente $2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$, resultando necesario el empleo de soluciones altamente concentradas de uno o más CP permeables que pueden ser tóxicas para las células. (t)

Durante el proceso de vitrificación, el embrión está sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento. Esto se debería a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor número de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va

aumentando en los espacios que aún no se congelan. Este choque osmótico es conocido como "efecto solución", y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia del embrión debido a la pérdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos. (p)

La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación en etilenglicol es la mórula compacta y blastocito temprano de embriones producidos *in vivo* o *in vitro*, así como también se ha demostrado que embriones producidos *in vitro* tienen menor tolerancia a la congelación debido a la formación de hielo intracelular, aumento en la concentración de lípidos y enzimas que digieren la zona pelúcida, lo que los hace más sensibles al enfriamiento y a la invasión de virus, bacterias y hongos. (k)

Figura 15. Pasos en la vitrificación de un embrión bovino.



Fuente: Técnicas para la Criopreservación de Embriones bovinos. Belascoain, Díaz, Hüter.

1.8. Selección de Vacas

1.8.1. Selección de Vacas Donadoras

El valor de la donadora puede ser definido de acuerdo a diferentes criterios según los beneficiarios. Sin embargo, en el caso de la aplicación práctica de la técnica para el mejoramiento genético del ganado, debemos escoger a las vacas más productivas

como donadoras. Además, estas vacas, deben de cumplir con los siguientes requisitos:

- a. No presentar enfermedades hereditarias.
- b. Tener excelente historial reproductivo y salud.
- c. Alto valor en el mercado.
- d. Ciclos estrales regulares.
- e. No tener enfermedades que afecten la fertilidad.
- f. No ser demasiado viejas. (t)

1.8.2. Selección de Vacas Receptoras

Para los programas de transferencia de embriones, se debe realizar una detallada selección de receptoras, con el fin de obtener las mayores tasas de preñez posibles.

Los parámetros de selección incluyen:

- Condición corporal.
- Peso.
- Habilidad materna.
- Evaluación reproductiva y estado sanitario.

En este último punto las futuras receptoras de embriones deben estar vacunadas contra brucelosis y recibir dos dosis de vacuna contra enfermedades reproductivas TRIANGLE 4, un mes antes de ingresar al programa de transferencia de embriones.
(8)

1.8.3. Protocolo de Superovulación con Folltropin

El objetivo principal de los tratamientos de superovulación en el ganado bovino es producir un gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez.

Descripción:

Es un extracto liofilizado de folitropina altamente purificado, obtenido por selección cuidadosa de glándulas pituitarias porcinas.

Composición:

FSH liofilizada, (equivalente a NIH): 400 mg.

Excipientes c.s.p.: 20 ml.

Acción:

Hormonal, Foliculoestimulante, FSH-Superovulación.

Indicaciones:

Para inducir la superovulación en vacas y vaquillonas aptas para la reproducción.

Contraindicaciones y Advertencias:

Reconstituya el producto usando estrictas medidas asépticas, use jeringas y agujas estériles para todas sus inyecciones. No usar este producto en cerdas.

Dosificación:

Administre 2,5 ml. (50mg) por inyección intramuscular dos veces al día durante cuatro días.

Observaciones:

Previamente a la colecta de los óvulos fertilizados producto de la superovulación de estos animales, el estro tendrá que ser inducido con prostaglandina F2 o una prostaglandina análoga a la F2 alfa. Administre la prostaglandina F2 alfa o su análogo

conforme las instrucciones del fabricante. Conjuntamente con la inyección número 6 de Folltropin-V a manera de inducir el estro para el apareamiento o inseminación.

Restricciones de Uso:

No sacrificar animales para consumo humano en los diez días siguientes a la última inyección de Folltropin-V. (o)

Figura 16. Protocolo Folltropin

Cuadro 1. Protocolo Folltropin® (donantes: vacas lecheras)		
Día	Hora	Descripción/Labor
0	am	CIDR-B + 5 mg BE + 100 mg P ₄ .
4	am	4 mL Folltropin®.
	pm	4 mL Folltropin®.
5	am	3 mL Folltropin®.
	pm	3 mL Folltropin®.
6	am	2 mL Folltropin® + 25 mg PGF _{2α} (5mL Lutalyse®).
	pm	2 mL Folltropin® + retirar CIDR-B + 25 mg PGF _{2α} (5mL Lutalyse®).
7	am	1 mL Folltropin®.
	pm	1 mL Folltropin® (observar Celo).
8	am	150µg GnRH (Gonadorelina) IM Chequeo de celo e IA a las 6 horas de iniciado el celo, repetir cada 12 horas hasta completar 3 IA. Utilizar camisa sanitaria en cada IA.
9	am	Inseminación artificial.
15	am	Lavado y recolección de embriones.

Fuente: Jorge Fernando Betancourth, Gabriel Cáceres Gutiérrez. (s)

1.8.4. Colección de Embriones (Transcervical)

Mediante un sencillo lavado de útero de la donadora, empleando para ello una solución salina a la que se adiciona suero sanguíneo y antibióticos. Primeramente se le aplica anestesia epidural en la base de la cola para evitar las contracciones del recto

y que permita la manipulación del útero durante los 15 a 20 minutos que dura el lavado. (12)

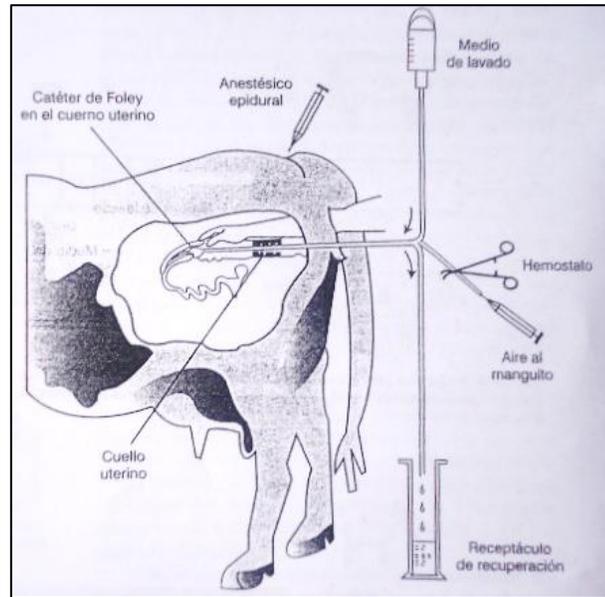
La técnica consiste en lavar varias veces el cuerno uterino con el medio de colección. Esto se consigue introduciendo el catéter de Foley a través del cérvix hasta la curvatura mayor del cuerno, lugar donde se fija inflando el globo del catéter, el cual se une a la manguera tygon. Por un lado de la bifurcación entra el medio al útero, cada vez que se llena este se le da un masaje, posteriormente se extrae el medio el cual sale hacia el filtro colector de embriones. Una vez lavado un cuerno, se saca el catéter y se repite la operación en el cuerno opuesto. (1)

El momento indicado para realizar la colección es entre el día 6.5 a 7 de iniciado el estro debido al tipo de estructuras que se encuentran en estos días considerando de que los embriones pasan del oviducto al cuerno uterino en el cuarto o quinto día. Después de la colección embrionaria las donadoras reciben una inyección de prostaglandinas F2 a 25 mg con el objeto de inducir la regresión de los cuerpos lúteos, evitar una posible gestación, incluso múltiple y acortar el periodo entre colecciones. (8)

Los embriones son microscópicos, por lo cual necesitamos localizarlos en el laboratorio con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Una vez terminado el lavado, el filtro se vacía en un recipiente de plástico y se enjuaga con solución a presión. El recipiente se revisa a 15 aumentos y al localizar cada embrión se va pasando con una pipeta a otro recipiente más pequeño que contiene la misma solución con más suero. (12)

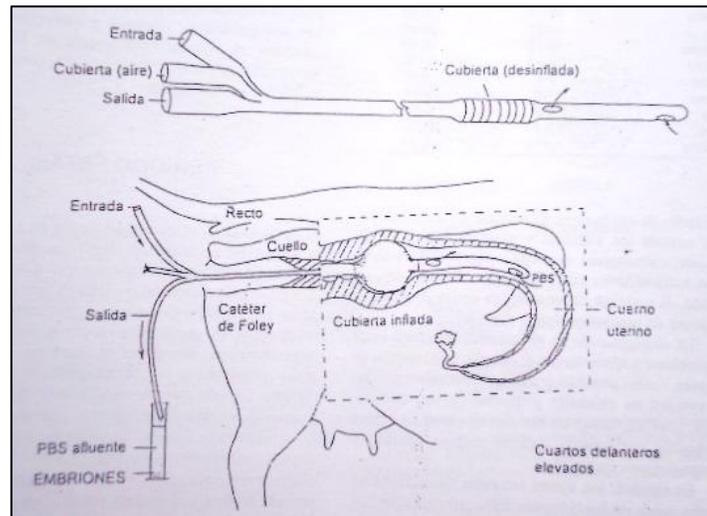
Sólo sirven para transferencia aquellos embriones que están en un estado de desarrollo de mórula o blástula, que es lo normal a los 7 días después de la fecundación. Los óvulos que no fueron fecundados y los embriones de escaso desarrollo son desechados. (v)

Figura 17. Representación Transcervical de Embriones.



Fuente: Hafez, 2000.

Figura 18. Diagrama de la Técnica de Recuperación no Quirúrgica de Embriones.



Fuente: Fisiología de Ruckebusch, Phaneuf, Dunlop.

1.9. Calificación de Embriones

La clasificación y evaluación de los embriones son sin duda los procedimientos más difíciles para aquellos técnicos y profesionales que comienzan a trabajar con esta biotecnología reproductiva. En realidad no es algo muy complicado pero requiere habilidad y experiencia. A continuación expongo para los interesados los aspectos más relevantes de estos dos procedimientos. (j)

Los embriones se buscan con un estereomicroscópio en magnificación 10-15X. Teniendo el medio en una caja de petri se pone una placa cuadriculada bajo esta para facilitar la búsqueda y clasificación. Luego de haber encontrado el último embrión se busca una o dos veces más para descartar que alguna futura cría se nos haya quedado en el medio. (f)

1.9.1. Calificación según la Madurez del Embrión

Evaluación de los embriones de acuerdo al desarrollo embrionario (Moreno 2004).

Cuadro 1. Calificación según la Madurez del Embrión.

GRADO DE DESARROLLO	EDAD DEL EMBRION	# DE CELULAS
Ovulo		
2 a 16 blastómeros	2 - 4 días	2-16
Mórula temprana	5 días	> 16
Mórula compacta	6 días	32 - 64

Blastocito temprano	7 días	160
Blastocito maduro	7 días	180
Blastocito expandido	8 días	200
Blastocito en eclosión	9 días	> 200
Embrión eclosionado		

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Figura 19. Cronología del Desarrollo Embrionario.



Fuente: Hafez, 2000.

1.9.2. Calificación de Embriones según la Calidad.

La evaluación la damos de acuerdo a sus características morfológicas. Estas características son subjetivas y pueden variar de un técnico a otro. Las características que debemos tener en cuenta para calificar un embrión son:

- Forma esferoide del embrión.
- Color y textura de la masa celular.
- Diferencia de tamaño entre los blastómeros.
- Número y nivel de compactación de los blastómeros.
- Tamaño del espacio perivitelino.
- Presencia de blastómeros sueltos o separados.
- Presencia o ausencia de vesículas.
- Forma y estado de la zona pelúcida. (f)
- Apariencia clara y neta de los blastómeros.
- Tonalidad oscura y uniforme.
- Uniformidad de la membrana celular.
- Proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino.
- Integridad de la zona pelúcida.
- Ausencia de vacuolas en el embrión y bridas celulares en el espacio perivitelino.
- Ausencia de detritus celulares adheridos a la zona pelúcida.
- Compactación de los blastómeros entre sí. (16)

Grados o códigos de calidad de los embriones, el rango para la calidad de los embriones es de 1-4:

Grado 1 Excelente o buen: Embriones uniformes en color tamaño y densidad.

Grado 2 Regular: Moderadamente presenta irregularidades en los embriones individuales en tamaño, color y densidad.

Grado 3 Pobre: Presenta mayores irregularidades en la masa del embrión en el tamaño color y densidad de las células individuales.

Grado 4 Degenerado: Embriones de una sola célula, estos embriones no son viables.

El embrión que se comercializa a nivel internacional es del grado 1 (Robertson 2002)

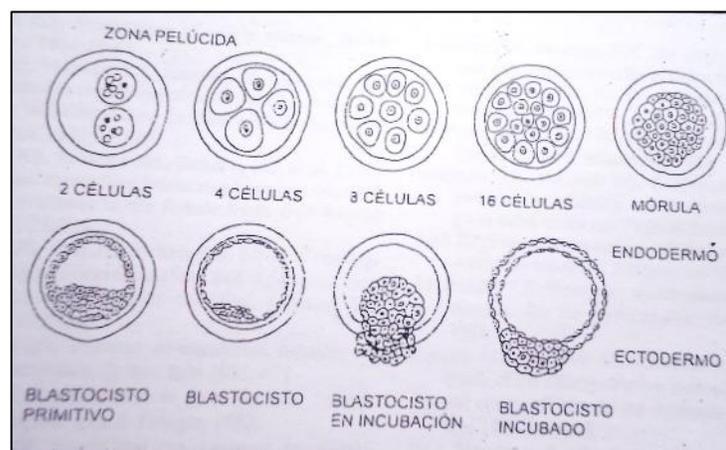
Cuadro 2. Calificación según la Calidad del Embrión.

CALIDAD DEL EMBRION	MORFOLOGIA
Excelente	Esférico, simétrico, células uniformes, buen color.
Bueno	Imperfecciones ligeras, blastómeros extruidos, vesículas.
Pobre o regular	Alteraciones más severas, vesículas, células degeneradas.
No transferible	Alteraciones graves, signos de degeneración, vesículas.

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Figura 20. Transformación del óvulo fertilizado o cigoto a blastocisto.



Fuente: Fisiología de Ruckebusch, Phaneuf, Dunlop.

1.9.3. Crio conservación de Embriones (Etilenglicol)

En algunos trabajos han descrito ventajas de los glicoles en la criopreservación de embriones porque sus moléculas son mucho más permeables. Se utilizan de forma exitosa también en soluciones vitrificantes, debido a que su peso molecular es menor que el del glicerol, propilenglicol y DMSO. De esta forma el etilenglicol es sumamente permeable en corto tiempo y es eliminado rápidamente durante la dilución, resultando en una disminución de la toxicidad embrionaria. (t)

CAPITULO II

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Ubicación del Ensayo

El presente trabajo investigativo se lo realizó en la Universidad Técnica de Cotopaxi campus Salache.

2.1.2. Datos Generales

Nombre o Razón Social: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI CENTRO EXPERIMENTAL Y DE PRODUCCIÓN SALACHE (CEYPSA)

Dirección:

Sitio: Salache Bajo

Parroquia: Eloy Alfaro.

Cantón: Latacunga

Provincia: Cotopaxi.

Longitud: 78°37'19,16" E

Latitud: 00°59'47,68" S

2.1.3. Coordenadas Cuadrícula Mercator UTM.

- N: 9888.749,37.
- E: 764.660,386.

Altitud

- 2703,04 msnm. (PARTE BAJA)
- 2757,59 msnm. (PARTE INTERMEDIA)
- 3047,39 msnm. (PARTE ALTA)

Figura 21. Mapa de Ubicación del CEYPSA.



Fuente: Administración del CEYPSA. Ing. Wilfrido Román C.

Cuadro 3. Características Climáticas y Edafológicas

VARIABLES	Características climáticas y edafológicas
Precipitación	500 a 1000 ml de lluvia anual.
Nubosidad promedio	Irregular.
Altitud	2757 m.s.n.m.
Humedad relativa	73.56% anual.
Clima	Seco Templado.
Temperatura	14.5 C promedio anual.
Heliografía	145.5395 horas sol/mes/promedio anual"
Velocidad del viento	2.5 m/s
Viento dominante	SE
Pluviosidad	550 mm anuales.

Fuente: Administración del CEYPSA. Ing. Wilfrido Román C.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Animales:

Donadoras: 5 Vacas de alto valor genético que cumplan con un buen manejo alimenticio, sanitario, no presenten enfermedades hereditarias, tengan un excelente historial reproductivo y que no sean demasiado viejas.

2.2.2. Materiales para el lavado de Embriones:

Cuadro 4. Materiales para el Lavado de Embriones

EQUIPOS	MEDICAMENTOS	MATERIALES	MEDIOS	ASEPSIA
Plancha térmica	Lidocaína	Matraz aforado de vidrio cuello ancho	Medio de transferencia Holding kit de tres tubos.	Papel Toalla
Tijeras Hemostáticas	Tranquilan	Sondas de lavado extremo Foley.	Medio de congelación Etilenglicol.	Gasas
Dilatador de cérvix, acero inoxidable	Xilazina	Tubos y tres vías para lavado de embriones.	Medio de lavado	Alcohol
Termómetro	Hormona superovulación.	Filtro MINIFLUSH para embriones.		Amonio cuaternario
Baño maría 10 litros		Caja Petri cuadrículada.		Guantes Ginecológicos
Esteriomicroscopio		Transfit lateral para transferencia de embriones.		
Mandrill para sonda de lavado		Chemis.		

Congelador de embriones Cryologic 5500		Jeringas		
		Mini pajuelas (pajillas) 0,25 ml		
		Pipetas Manuales		
		Puntas para micro pipeta		

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

2.2.3. Otros Materiales

- Overol.
- Botas.
- Cámara Fotográfica.
- Computadora.
- Material de papelería.

2.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.3.1. Diseño Metodológico.

2.3.1.1. Tipo de investigación.

2.3.1.1.1. INVESTIGACION EXPERIMENTAL

Este tipo de investigación consiste en la manipulación de una o más variables experimentales no comprobadas, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o porque causa se produce una situación o acontecimiento particular.

2.3.1.1.2. INVESTIGACION DESCRIPTIVA

Conocida como la investigación estadística, describen los datos. Su meta no se limita a la recolección de datos, sino a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables.

2.3.1.2. METODOLOGIA

2.3.1.2.1. METODO INDUCTIVO

El método inductivo o inductivismo es aquel método científico que obtiene conclusiones generales a partir de premisas particulares. Se trata del método científico más usual, en el que pueden distinguirse cuatro pasos esenciales: la observación de los hechos para su registro; la clasificación y el estudio de estos hechos; la derivación inductiva que parte de los hechos y permite llegar a una generalización; y la contrastación.

2.3.1.2.2. METODO DEDUCTIVO

La deducción va de lo general a lo particular. El método deductivo es aquél que parte los datos generales aceptados como valederos, para deducir por medio del razonamiento lógico, varias suposiciones, es decir; parte de verdades previamente establecidas como principios generales, para luego aplicarlo a casos individuales y comprobar así su validez.

2.3.1.3. Unidad Experimental

Se contó con 10 embriones en donde cada uno constituye una unidad experimental.

2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizará la prueba del T' de student ya que se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño.

2.4.1. Descripción de los Tratamientos

Cuadro 5. Descripción de los Tratamientos

TRATAMIENTO	SIMBOLOGIA	UNIDAD EXPERIMENTAL
Descenso de temperatura de 0.3 °C por minuto.	T1	5
Descenso de temperatura de 0.7 °C por minuto.	T2	5
TOTAL		10

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

2.5 MANEJO DE VARIABLES

- Porcentaje de viabilidad de los embriones pos descongelación utilizando los dos métodos de descenso de temperatura de 0.3 °C por minuto y 0.7 °C por minuto. Sus resultados se expresaron en porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Viabilidad} = (\# \text{ de Embriones vivo} / \text{Total de embriones congelados}) \times 100$$

- La mortalidad de los embriones se interpretó de acuerdo al porcentaje de la viabilidad.
- Embriones anormales se determinó mediante su calidad y madurez.

2.6. MANEJO DEL ENSAYO

La investigación se realizó en 5 vacas donadoras de las cuales se estuvo un total de 39 embriones los mismos que fueron mórulas tempranas, mórulas compactas, blastocistos y blastocistos expandidos.

2.6.1. Distribución del Ensayo.

Cuadro 6. Distribución del Ensayo.

EMBRIONES	5 Mórulas Compactas	5 Mórulas Compactas	TOTAL 10 Embriones
TRATAMIENTOS	T1 0.3 °C por minuto.	T2 0.7 °C por minuto.	

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

2.6.2. Selección de Vacas Donadoras.

No presentar enfermedades hereditarias, tener excelente historial reproductivo y salud, ciclos estrales regulares, no tener enfermedades que afecten la fertilidad, no ser demasiado viejas. (b)

2.6.3. Aplicación del Protocolo de Superovulación.

Figura 22. Protocolo Folltropin

Cuadro 1. Protocolo Folltropin® (donantes: vacas lecheras)		
Día	Hora	Descripción/Labor
0	am	CIDR-B + 5 mg BE + 100 mg P ₄ .
4	am	4 mL Folltropin®.
	pm	4 mL Folltropin®.
5	am	3 mL Folltropin®.
	pm	3 mL Folltropin®.
6	am	2 mL Folltropin® + 25 mg PGF ₂ α (5mL Lutalyse®).
	pm	2 mL Folltropin® + retirar CIDR-B + 25 mg PGF ₂ α (5mL Lutalyse®).
7	am	1 mL Folltropin®.
	pm	1 mL Folltropin® (observar Celo).
8	am	150µg GnRH (Gonadorelina) IM Chequeo de celo e IA a las 6 horas de iniciado el celo, repetir cada 12 horas hasta completar 3 IA. Utilizar camisa sanitaria en cada IA.
9	am	Inseminación artificial.
15	am	Lavado y recolección de embriones.

Fuente: Jorge Betancourth, Gabriel Cáceres.

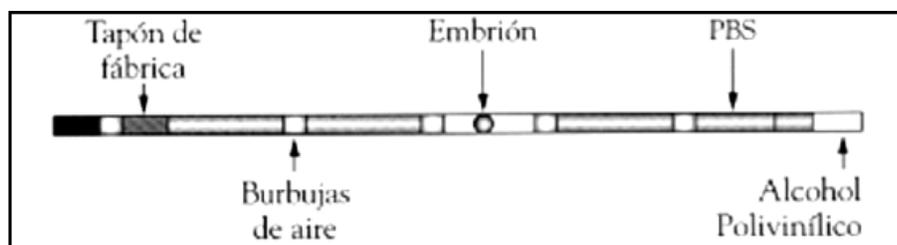
2.6.4. Lavado de embriones: Métodos no quirúrgicos de recolección (transcervical)

2.6.5. Calificación de embriones: Según su madurez y según su calidad.

2.6.6. Crioconservación de embriones

Los embriones son congelados previo a la aplicación de un crio protector que modifican el comportamiento físico de la solución y protegen a las células de los daños asociados al descenso térmico. Envasado de los embriones en una pajuela de plástico de 0,25 ml de capacidad.

Figura 23. Esquema de una pajuela plástica para cargar embriones



Fuente: Hafez 2001.

El descenso térmico se efectuó utilizando la máquina congeladora de embriones Cryologic 5500 aplicando el descenso térmico lento que es de 0.3 °C por minuto y el descenso rápido de 0.7 °C por minuto. De este modo se logró una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización intracelular.

Descongelación. Este procedimiento se efectuó de manera rápida para impedir el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación. Las pajuelas son retiradas del N₂ líquido e introducidas en un baño María a 30°C aproximadamente.

Luego de la congelación-descongelación se extrajo el crio protector y se observaron nuevamente los embriones para determinar su viabilidad a los dos tratamientos aplicados.

2.6.7. Aplicación de Tratamientos.

Tratamiento # 1

Se realizó la Crioconservación a 0.3 °C por minuto a 5 embriones específicamente mórulas compactas.

Tratamiento # 2

Se realizó la Crioconservación a 0.7 °C por minuto a 5 embriones específicamente mórulas compactas.

La congelación se realizó a los 10 embriones, siendo todas mórulas compactas de Tipo 1, esperando tener éxito en la viabilidad de embriones post descongelados.

CAPITULO III

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

Cuadro 7. Embriones Recolectados

VACAS	EMBRIONES	% Embriones
Fiona 0351	10	25.64
Fiona 0706	6	15.4
Fiona 0728	5	12.82
Fiona 0732	10	25.64
Fiona 0354	8	20.51
TOTAL	39	100 %

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

En el cuadro 7 se puede observar que los embriones fueron recolectados de 5 vacas; con el lavado que se les realizó tuvimos un total de 39 embriones en la colecta. Como podemos darnos cuenta las dos vacas Fiona 0351 y Fiona 0732 son las que mayor número de embriones tienen correspondiente al 25.64% seguido de la vaca Fiona 0354 que tuvo 8 embriones con el 20.51%; Fiona

0706 tuvo 6 embriones con el 15.4%; Fiona 0728 tuvo 5 embriones con el 12.82%. Teniendo 39 embriones recolectados lo que equivale al 100%.

Cuadro 8. Embriones Recolectados Calificados Según su Madurez

VACAS	EMBRIONES RECOLECTADOS	MORULA TEMPRANA	MORULA COMPACTA	BLASTOCISTO	BLASTOCISTO EXPANDIDO
Fiona 0351	10		10		
Fiona 0706	6		2	2	2
Fiona 0728	5		4	1	
Fiona 0732	10		9	1	
Fiona 0354	8	1	3	3	1
TOTAL	39	1	28	7	3

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

En el cuadro 8 nos indica el número de vacas que fueron parte de nuestro ensayo con su respectivo número de embriones recolectados; de las cinco vacas que fueron seleccionadas como donadoras se puede apreciar que de tres de ellas se obtuvo la mayoría de mórulas compactas, teniendo un total de 39 embriones recolectados; los mismos que fueron clasificados según su madurez. Obtuvimos un total de 28 mórulas compactas, 7 blastocistos, 3 blastocistos expandidos y una mórula temprana. Teniendo en cuenta que lo q más se recolectó fueron mórulas compactas seguido de blastocistos.

Cuadro 9. Embriones Recolectados Calificados Según su Calidad.

VACAS	EMBRIONES RECOLECTADOS	TIPO 1 Excelente	TIPO 2 Regular	TIPO 3 Malos	TIPO 4 Degenerados
Fiona 0351	10	3	3		4
Fiona 0706	6	5			1
Fiona 0728	5	5			
Fiona 0732	10	10			
Fiona 0354	8	6	2		
TOTAL	39	29	5		5

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

En el cuadro 9 se puede observar la clasificación de los embriones según la calidad; en el mismo se puede apreciar el número de embriones recolectados que fueron 39, seguido de un total de 29 embriones de Tipo 1 que significa que estos son excelentes para poder crioconservarlos, luego tenemos 5 embriones de tipo 2 (regular) y 5 embriones de tipo 4 (degenerados). Fiona 0732 fue la vaca que mayor número de embriones de tipo 1 se recolecto, seguido de Fiona 0354 que se obtuvo 6 embriones y finalmente Fiona 0728 y Fiona 0706 que tuvieron 5 embriones cada una.

Cuadro 10. Viabilidad de los Embriones.

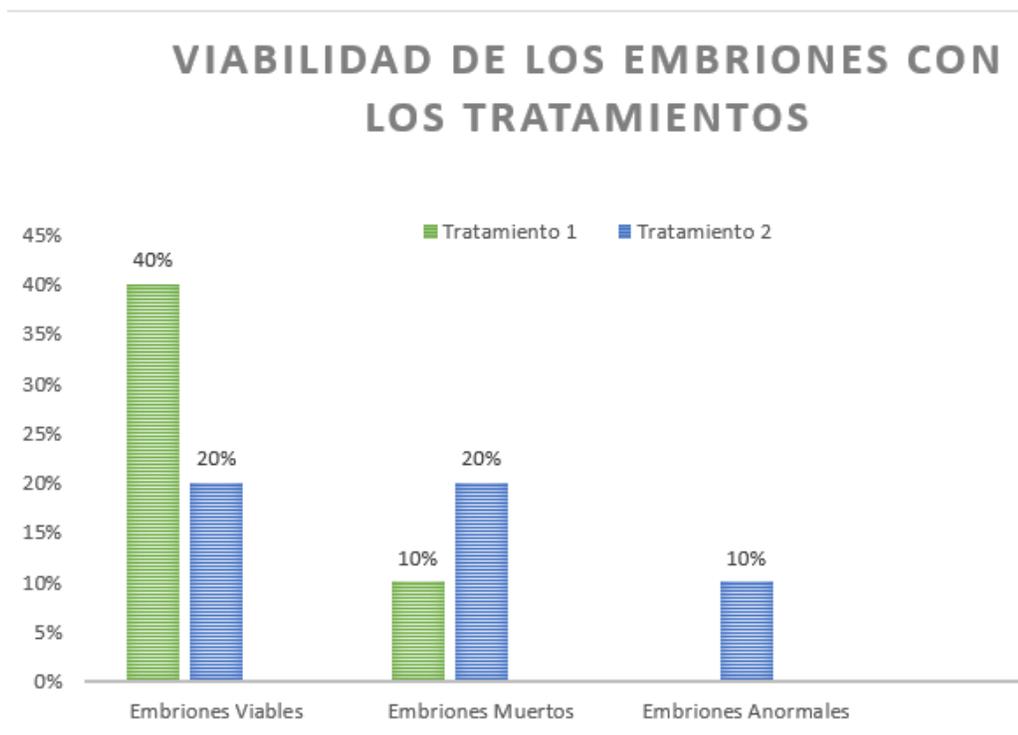
TRATAMIENTOS	EMBRIONES VIVOS		EMBRIONES MUERTOS		EMBRIONES ANORMALES	
	Número	%	Número	%	Número	%
T1	4	40%	1	10%		
T2	2	20%	2	20%	1	10%
TOTAL	6	60%	3	30%	1	10%

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

En la cuadro 10 nos indica todo los resultados que se llevó a cabo en esta investigación, donde el T1 fue el que tuvo mayor viabilidad con los embriones post descongelados siendo el 40% y un 10 % de mortalidad lo que indica que con la crioconservación a 0.3 °C por minuto se pudo obtener mayor viabilidad por que sobrevivieron 4 embriones, un embrión muerto y ningún embrión anormal. Mientras que en el T2 se obtuvo un porcentaje de 20% de viabilidad, 20% de mortalidad y 10 % de embriones anormales; lo que indica que con la crioconservación a 0.7 °C por minuto no se pudo obtener viabilidad ya que a este tratamiento solo 2 embriones fueron viables.

Grafico 1. Viabilidad de los Embriones con los Tratamientos.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Como se puede observar en el gráfico el T1 es el que mejor dio resultado no obtuvimos embriones anormales, tan solo un embrión muerto y a 4 embriones viables. Dando como resultado que el T1 si fue muy satisfactorio a comparación del T2 que tuvo 2 embriones viables, 2 embriones muertos y un embrión anormal.

Con el T1 tenemos el 40% de viabilidad y el 10% de mortalidad; a comparación del T2 que representa al 20% de embriones viables, el 20% de mortalidad y el 10% de anormalidad den los embriones.

3.1. Prueba del T' student

Cuadro 11. Prueba del T' student

	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2
Media	0.6	0.4
Varianza	0.3	0.3
Observaciones	5	5
Grados de Libertad	4	
Estadística	0.53	
P valor	0.62	
Valor Crítico	2.78	

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

En el cuadro 11 tenemos la representación de la prueba del t' Student con los datos de nuestra investigación ya que es un método de análisis estadístico, que compara las medias de dos grupos diferentes. Siendo una prueba paramétrica, o sea que solo sirve para comparar variables numéricas de distribución normal. Se utilizó para las comparaciones de los resultados de una prueba antes y después para cada tratamiento. Interpretando la prueba tenemos lo siguiente: Estadística $0.53 < 2.78$ (Valor Crítico)

Significa que si el valor crítico es menor que el valor de estadística quiere decir que NO ES SIGNIFICATIVO en otras palabras el Tratamiento 1 es igual al Tratamiento 2 ($T_1=T_2$)

CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestros resultados arribamos a las siguientes conclusiones:

- El protocolo de congelación lenta 0.3 °C por minuto tuvo mayor efectividad producido in vivo.
- Los embriones producidos in vivo muestran una mayor tolerancia a los procesos de criopreservación practicados en nuestro estudio.
- Al evaluar la interacción entre el método de criopreservación y modo de obtención de los embriones, concluimos que el método de congelación lenta y los embriones producidos in vivo son los más eficientes.

RECOMENDACIONES

- Al momento de implementar un programa de crio conservación de embriones tanto producidos in vivo como in vitro, se recomienda que se emplee el protocolo de congelación lenta.
- Se recomienda realizar otras investigaciones para evaluar tasas de gestación y compararlas con los resultados obtenidos in vivo.
- En el caso de los embriones producidos in vitro es recomendable ensayar nuevos protocolos de criopreservación que aporten resultados superiores para favorecer la comercialización a gran escala de este tipo de embriones.

BIBLIOGRAFIA

1. **Betancourth, J, Cáceres G**, Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales, Ciencia y Producción Agropecuarias, pag.5. 18/02/2013.10:30am.
2. **Cabodevila J., Teruel M., 2001.** Criopreservación de embriones bovinos. En: DIETL, J. 1986. Struktur und Funktion der Zona Pellucida. En: Ferdinand Enke Verlag (ed.), Stuttgart, 1-184. 18/02/2013. 11:30am.
3. Ciencia Veterinaria volumen 9-Numero 1-2007 General Pico-La Pampa, República Argentina. ISSN: 1515-1883. 10/02/2013 3pm.
4. **CRUZ, Armando, 2008.** Atlas de Reproducción Animal. Foliculogénesis. (ed.) Gráficas CORRAL. Ambato pag.44. 15/02/2013
5. Fisiología de pequeñas y grandes especies 1994. Capítulo 54. Vida y ciclos reproductivos de los animales. (ed.) El manual moderno. S.A. de C.V. México, pp 717-718. 15/03/2013. 14:00pm.
6. **HAFEZ 2007.** Reproducción e Inseminación Artificial En Animales, Séptima Edición Mc Gran-Hill-1996 ISBN 0-683-30577-8.
7. **HAFEZ B. 2002.** Cap. 3.Hormonas, factores de crecimiento y reproducción En: Reproducción e inseminación artificial en animales. (ed.) Mc Graw-Hill Interamericana, Edición 2002 México, pp 33 12/02/2013 11am
8. **HAFEZ E. S. E. 2002.** Cap. 29. Inducción de ovulación, producción y transferencia de embriones. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. (ed.) Mc Graw-Hill Interamericana, México, pp 434-435.12/02/2013. 11:30am
9. **HAFEZ, E. S. E. 2002.** Cap. 4. Ciclos reproductivos En: Reproducción e inseminación artificial en animales. (ed.) Mc Graw-Hill Interamericana, México, pp 434-435.12/03/2013. 10:30am

10. **JAINUDEEN M. R., WAHID H., HAFEZ E. S. E. 2002.** Cap. 29. Inducción de ovulación, producción y transferencia de embriones. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. (ed.) Mc Graw-Hill Interamericana, México, pp 434-435 10/02/2013 5pm.
11. **KONIG, Liebich,** Anatomía de los Animales Domésticos, Editorial Medica Panamericana S.A., Edición 2005, Tomo 2. pág. 145 11/02/2013 9am.
12. **M. CELESTINOS, M.V.Z.; R. GATICA, M.V., Ph.D.** Instituto de Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, CHILE ,Congelación de embriones bovinos producidos in vitro Última actualización 17/10/2003@10:16:48 GMT+1. 19/02/2013 4:30 pm.
13. **PALMA, Gustavo,** Biotecnología de la reproducción, Libri mundi, Edición 2001, pag.37, 38. 11/02/2013 9:30am
14. **PALMA, Gustavo,** Evaluación morfológica de los embriones, Libri mundi, Edición 2001, pág. 78,81. . 11/02/2013 9:35am
15. **PALMA, Gustavo,** Recolección de los embriones, , Libri mundi, Edición 2001, pág. 60. . 11/02/2013 9:38am
16. **Roa N. A., Linares T., Tamasaukas R. 1998.** Métodos y aplicaciones de la criopreservación de oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos. Una revisión. Revista Científica, FCV-LUZ/ Vol. VIII, Nº 1, 40-52
17. **Universidad de Sevilla, 2003.** Cap. 3 Anatomía y Fisiología de los aparatos reproductores de la hembra y el macho. En: Bases de la producción animal. (ed.) libri mundi, Sevilla España pag.66. 13/02/2013 14:30pm.

BIBLIOGRAFIA DEL INTERNET

a. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA BOVINA

www.select sires.com en línea 14/02/2013. 8am.

b. ANATOMIA Y FISILOGIA DEL TRACTO REPRODUCTIVO

PARTE 2. <http://cegbucc.foroes.biz/t23-anatomia-y-fisiologia-del-tracto-reproductivo-parte2>. 15/02/2013 9am.

c. ANATOMIA Y FISILOGIA DE LA VACA.

<http://personal.globered.com/reproduccion/categoria.asp?idcat=23>. 15/02/2013 10:30am.

d. APARATO REPRODUCTOR DE LA VACA.

www.ganasal.com 16/02/2013. 4pm

e. ASOCIACIÓN CANADIENSE DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

www.ceta.ca.

f. CABODEVILA J., Teruel M., 2001. Criopreservación de embriones bovinos.

En: Biotecnología de la reproducción. (ed.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. Argentina, pp. 149-174

g. CABRERA P., FERNÁNDEZ A. 2006. Criopreservación de Embriones: una

herramienta básica en la Reproducción Asistida. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinaria Central de Venezuela 2009.

http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025865762006000200001&lng=es&nrm=iso Activo agosto 2009.

- h. **CICLO ESTRAL.**
www.buiatriapaysandu.org/ateneos/ciclo_estral1.pdf. 16/02/2013. 3pm
- i. **CIENCIAS BIOLÓGICAS Y EDUCACIÓN PARA LA SALUD.**
<http://hnnccbiol.blogspot.com/2008/01/ovogenesis.html>
- j. **CLASIFICACIÓN Y CALIFICACIÓN EMBRIONARIA.**
<http://jairoserano.com/2009/12/calificacion-y-clasificacion-embriionaria/15/02/2013> 10am.
- k. **CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES: UNA HERRAMIENTA BÁSICA EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA.** Cabrera P., Fernández A. 2006. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinaria Central de Venezuela 2009. Venezuela. Publicado en internet, disponible en congelacion_embriiones.htm Activo Agosto 2009. 15/02/2013 5pm.
- l. **CRIOPROTECTORES.** Publicado en internet, disponible en Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela.
<http://www.monografias.com/trabajos903/vitrificacion-tecniacrioconservacion/vitrificacion-tecnica-crioconservacion2.shtml>.
- m. **DIEZ Monforte C. 2003.** Congelación de embriones producidos In Vitro. Publicado en internet, disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/08-congelacion_embriiones.htm Activo Agosto 2009.

- n. **FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO FOLICULAR, EMBRIONARIO TEMPRANO E IMPLANTACIÓN. IMPLICACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS.** Revista MVZ Córdoba, enero junio, año/vol. 12, número 001.Universidad de Córdoba Montería, Colombia pp. 942-954
http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/08-14/02/2013 10am.
- o. **FOLLTROPIN-V**
www.syntexar.com/es/productos_veterinarios/folltropin_v_?PHPSESSID=c337baef8e66a2fed8c1ac9dab9f3682. 18/02/2013.8:30am.
- p. **G.A. PALMA 2001.**
http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_07.pdf.
- q. **INSEMINACION ARTIFICIAL EN BOVINOS PARTE.**
<http://www.monografias.com/trabajos39/inseminacion-bovinos/inseminacion-bovinos2.shtml#ixzz2uy18VRFJ>.
- r. **MANIPULACIÓN DEL CICLO ESTRAL EN GANADO BOVINO.**
<http://www.webveterinaria.com/virbac/news23/bovinos.pdf>
- s. **MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL LABORATORIO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS DE LA EMPRESA GENETIC RESOURCES INTERNATIONAL (GRI) AND SEXING TECHNOLOGIES, JULIO CÉSAR ORELLANA BANEGAS, EVER MANUEL PERALTA PERALTA.**
<http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf>
- t. **MANUAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES OCTUBRE 2006.**

<http://www.producechiapas.org/manuales/Transferencia%20de%20Embriones%20en%20el%20Ganado%20Bovino.pdf>

u. **PARTES DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA VACA.**

http://www.ehowenespanol.com/partes-del-sistema-reproductor-vaca-info_193146/

v. **REPRODUCCION BOVINA.**

<http://reproduccioncarlos.blogspot.com/2009/08/aparato-reproductor-de-la-hembra-bovina.html>. 16/02/2013 1pm.

w. **REPRODUCCION, MVZ Gustavo A. González Guadarrama**

<http://www.webveterinaria.com/virbac/news12/bovinos.pdf>

x. **REVISION ANATOMICA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LAS VACAS** Humberto Rivera M, MS. Accelerated Genetics.

<http://www.dcrcouncil.org/media/Public/Rivera%20DCRCH%202009.pdf>.

y. **SEIDEL Y SEIDEL EN UNA PUBLICACIÓN DE LA FAO EN 1991.**

<http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E00.HTM>.

z. **TECNOLOGIA EN REPRODUCCION BOVINA.**

<http://reproduccion-bovina2010.blogspot.com/2011/03/protocolo-te-donadora-n-5805-celo.html>.16/02/2013 11am.

aa. **UNION GANADERA REGIONAL DE JALISCO.**

www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=573&Itemid=140.65762006000200001&lng=es&nrm=iso Activo agosto 2009. 18/02/2013. 9am

BIBLIOGRAFIA DE LAS FIGURAS

Figura 1. www.ganasal.com

Figura 2. Senger 2004.

Figura 3. <http://jairoserrano.com>

Figura 4. www.webveterinaria.com

Figura 5. MVZ, MC ERIC B. FRAGA ESCAMILLA 2009.

Figura 6. <http://salesganasal.com>

Figura 7. saludentretodos.files.wordpress.com

Figura 8. www.quimicaviva.com

Figura 9. Palma, G., 2001

Figura 10. Palma, G., 2001

Figura 11. Palma, G., 2001

Figura 12. Palma, G., 2001

Figura 13. Palma, G., 2001

Figura 14. Técnicas para la Criopreservación de Embriones bovinos. Belascoain, Díaz, Hüter.

Figura 15. Técnicas para la Criopreservación de Embriones bovinos. Belascoain, Díaz, Hüter.

Figura 16. Jorge Fernando Betancourth, Gabriel Cáceres Gutiérrez.

Figura 17. Hafez, 2000.

Figura 18. Fisiología de Ruckebusch, Phaneuf, Dunlop.

Figura 19. Hafez, 2000.

Figura 20. Fisiología de Ruckebusch, Phaneuf, Dunlop

Figura 21. Administración del CEYPSA. Ing. Wilfrido Román C.

Figura 22. Jorge Betancourth, Gabriel Cáceres

Figura 23. Hafez 2001.

ANEXOS

ANEXO 1
PLANTILLA DE SUPEROVULACION

Donante N°: Raza:.....
 Procedencia:..... Edad:.....

Fecha último celo:
 Observaciones.....

Superovulación: Droga:.....
 Dilución:.....

Esquema de tratamiento:

 Fecha del celo:

Inseminación Artificial (IA):
 1° IA:..... 3°IA:.....
 2° IA:..... 4°IA:.....
 Observaciones:.....

Tacto previo:

	Ovario Derecho	Ovario Izquierdo
Folículos		
Cuerpos lúteos		

Recolección de embriones:..... Día: Hora:
 Observaciones:.....

Evaluación morfológica:.....
 Embriones viables:..... Clasificación:
 Embriones anormales:.....
 Ovocitos sin fecundar:.....
 Total recolectado:.....

Celo post-superovulación:

.....
 Firma del Responsable Firma del Transferencista Firma del Propietario

ANEXO 2

Calificación de Embriones HACIENDA

Nombre:

Raza:

Edad:

MADUREZ CALIDAD	Mórulas Temprana	Mórulas Compactas	Blastocisto	Blastocisto Expandido
Tipo1(Excelentes)				
Tipo2(Regulares)				
Tipo3(Malos)				
Tipo4(Degenerados)				

Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

ANEXO 3

PLANTILLA DE CLASIFICACION PARA EMBRIONES BOVINOS

Nombre de la Madre:..... Raza:.....
 Nombre del Padre:..... Raza:.....

GRADO DE DESARROLLO	CANTIDAD	EDAD DEL EMBRION	# DE CELULAS
Ovulo			
2 a 16 blastómeros		2 - 4 días	2-16
Mórula temprana		5 días	> 16
Mórula compacta		6 días	32 - 64
Blastocito temprano		7 días	160
Blastocito maduro		7 días	180
Blastocito expandido		8 días	200
Blastocito en eclosión		9 días	> 200
Embrión eclosionado			
TOTAL DE EMBRIONES COLECTADOS			

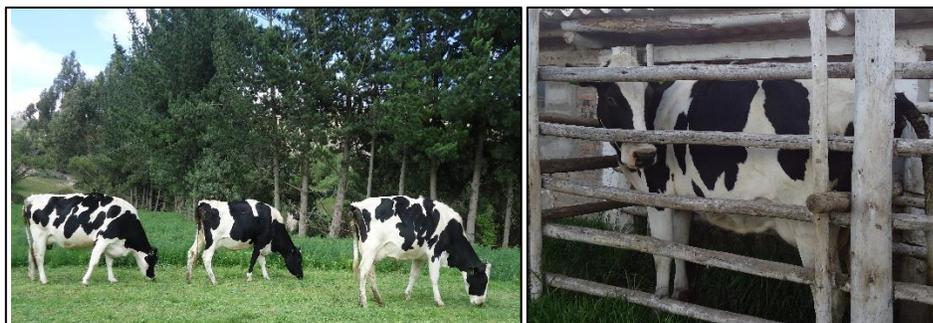
CALIDAD DEL EMBRION	CANTIDAD	MORFOLOGIA
Excelente		Esférico, simétrico, células uniformes, buen color.
Bueno		Imperfecciones ligeras, blastómeros extruidos, vesículas.
Pobre o regular		Alteraciones más severas, vesículas, células degeneradas.
No transferible		Alteraciones graves, signos de degeneración, vesículas.

Total de Embriones Viables:.....
Total de Embriones No Viables:.....
Total de Embriones Implantados:.....
Total de Embriones Congelados:.....

ANEXO 4

FOTOS DEL ENSAYO

Imagen 11. Selección de las Donadoras.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 12. Chequeo a las Donadoras.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 13. Aplicación del Tratamiento.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 14. Recolección de los Embriones.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 15. Observación de los Embriones.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 16. Observación y Calificación de los Embriones.



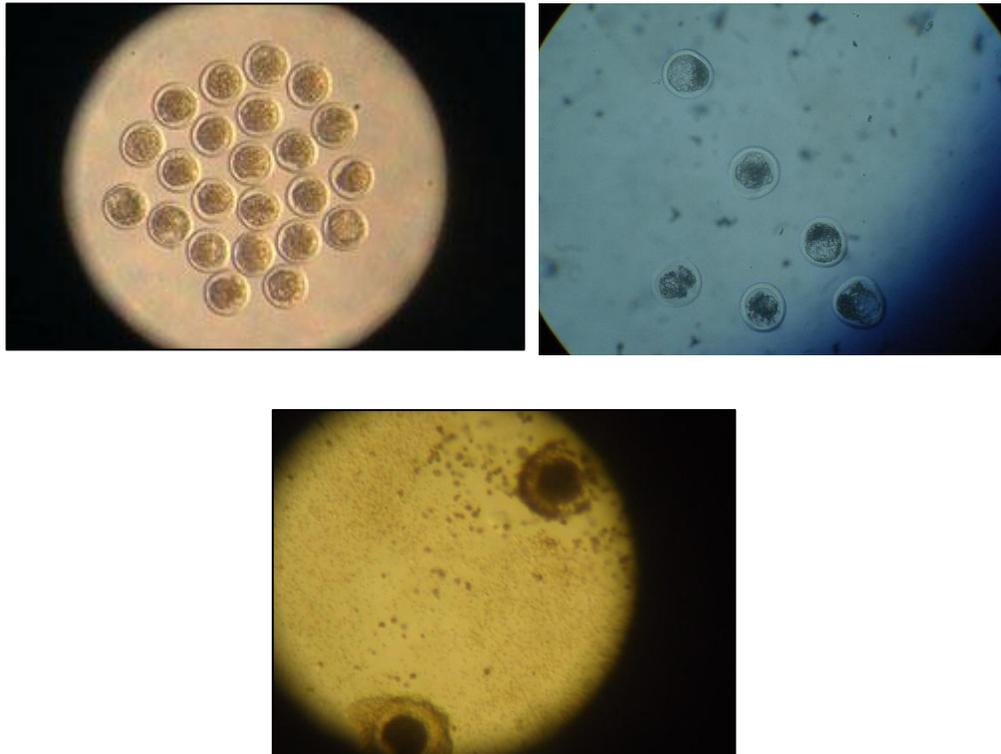
Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 17. Observación y Calificación de los Embriones.



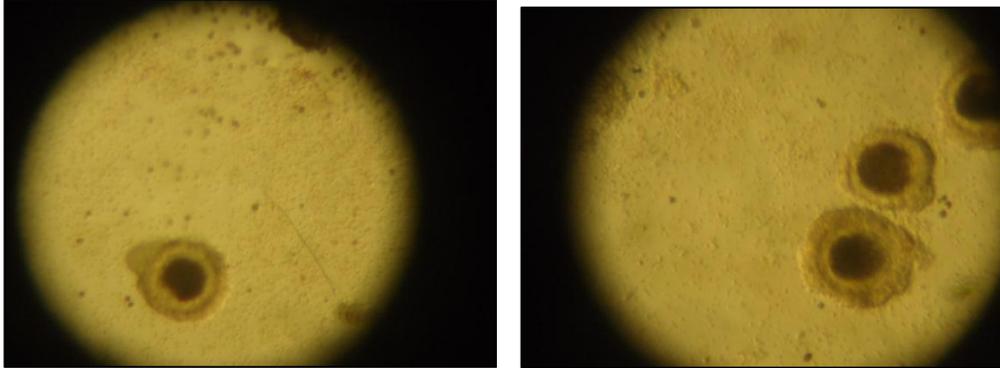
Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 18. Embriones Recolectados y Mórulas Compactas.



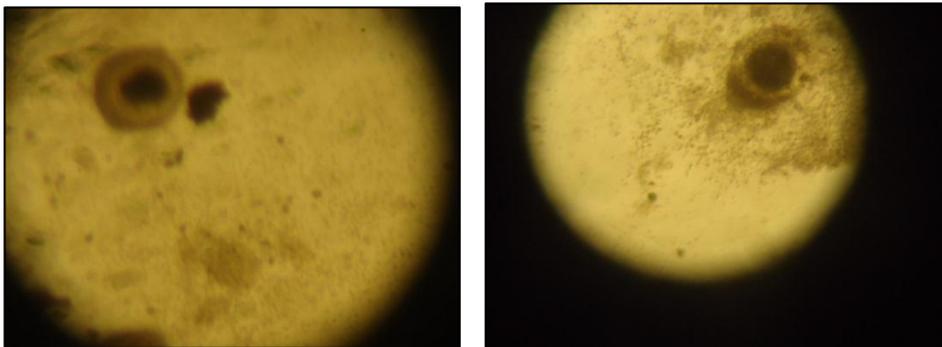
Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 19. Mórulas Compactas.



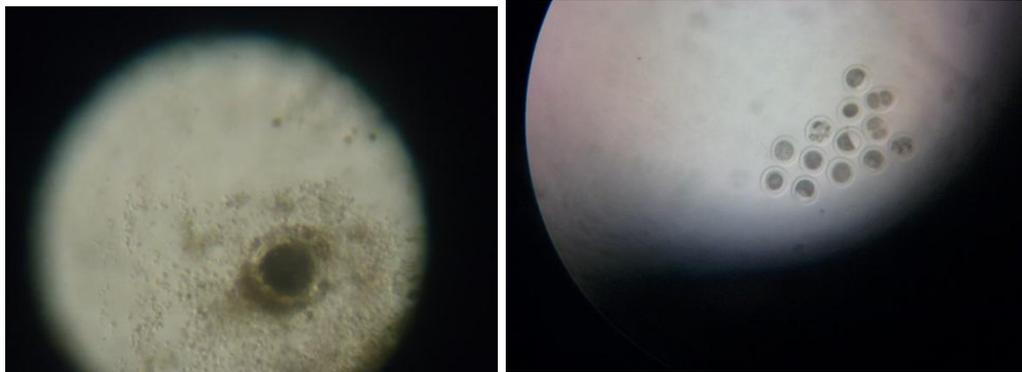
Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 20. Mórulas Compactas.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 21. Mórulas Compactas, Mórulas Tempranas, Blastocisto Temprano y Blastocisto Expandidos.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 22. Máquina Congeladora de Embriones.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 23. Crioconservación de Embriones.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

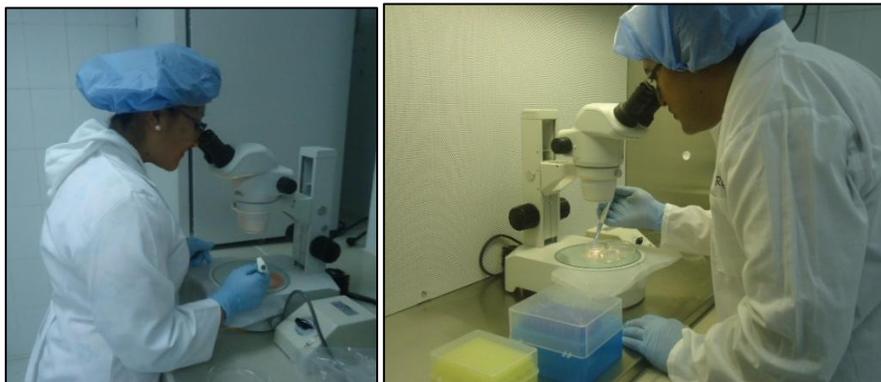
Imagen 24. Extracción de las pajuelas.



Fuente: Directa

Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis.

Imagen 25. Verificación de los Embriones Crioconservados post descongelados.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis

Imagen 26. Final de Ensayo.



Fuente: Directa
Autores: GARCIA, Verónica; MONTENEGRO, Luis