

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TITULO

**“MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES DE MAMÍFEROS
DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE LA BIOTECNOLOGÍA DE
REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.”**

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTOR: Zambonino Bautista Gabriela Elizabeth

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Cristian Arcos

Latacunga - Ecuador

2013-2014

Dr. MSc.

Enrique Estupiñán

DIRECTOR DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES.

Presente.-

De mi consideración.

Reciba un cordial saludo y a la vez deseándole éxitos en sus funciones como Director
Académico.

En Calidad de Director de Tesis del Tema **“MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE
EMBRIONES DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE LA BIOTECNOLOGÍA
DE REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**. Debo mencionar que
esta Tesis ha sido elaborada por la Señorita Zambonino Bautista Gabriela Elizabeth ,
portador de la Cédula de Identidad N° 0503492340, como requisito previo a la obtención del
título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y
Grados, consideró 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, la postulante con el tema de tesis **“MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE LA BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA 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.

Atentamente:

Dra. Nancy Cueva

Presidente

Dra. Janeth Molina

Opositor

Dra. Paola Lascano

Miembro

AUTORÍA

Yo, Zambonino Bautista Gabriela Elizabeth, 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 reglamento y por la normativa institucional vigente.

Zambonino Bautista Gabriela Elizabeth

050349234-0

Agradecimiento

El presente trabajo de tesis quiero dar la gloria y la honra a mi Padre Dios quien ha sido la fuerza y fortaleza en todos los procesos de mi vida para llegar a cumplir las metas anheladas en el sueño mas grade de un ser humano a realizarse como persona y profesional.

A mi Madre una mujer de admiración mi Padre y mis hermanos por el apoyo incondicional en cada momento del camino y por esa vos de aliento en un TU SI PUEDES.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL COTOPAXI por acogerme y brindame la oportunidad de poder estudiar y alcanzar mi sueño anhelado.

A mi Director de tesis y docentes que han contribuido en los años de estudio con conocimientos, enseñanzas, consejos, alegrías ,amistad, apoyo, rectitud ya que son pilar importante para el desarrollo como profesional.

y no podría terminar sin agradecer a mis amigas y amigos que son parte fundamental de una vida de Universidad, donde la vida te enseña a saber cuáles son tus verdaderos amigos y quienes no , porque los buenos son tu apoyo y los malos tu fortaleza.

Gabriela

Dedicatoria

A Dios por su inmenso amor y sabiduría por guiarme a culminar esta etapa importante de mi vida y permitirme compartir este momento con las personas que más amo en la Vida.

A mi Madre por ser lo más hermoso que Dios pudo ponerme en la vida, por ser esa luz al final del camino esperándome con sus brazos abiertos y amor infinito.

A mi Padre por ser esa fortaleza la cual me ha permitido luchar y llegar al final.

A mis Hermanos Mery y Geovanny por el apoyo incondicional en todo sentido porque son el ejemplo a seguir para realizarme como persona y profesional

A mis Abuelitas ya que son donde puedo encontrar ese amor tan especial que solo ellas te pueden dar

A toda mi familia quien es parte fundamental en mi vida porque siempre he recibido una voz de aliento, a mis sobrinas y que llenan de mucha alegría mi vida

A mis amig@s, quien también forma parte de mi vida quienes han estado en muchos momentos y por prestarme su mano amiga y desinteresada.

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”

.....

Gabriela Elizabeth Zambonino Bautista

Resumen

El Laboratorio de reproducción, en la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi consta de equipos con los cuales los alumnos realizan prácticas bajo la dirección de un docente, siguiendo las normas establecidas dentro del laboratorio y usando los equipos adecuadamente, transformando de esta manera la parte teoría recibida en las aulas de clases en una aceptada realidad.

En el presente trabajo, el objetivo primordial es la elaboración de un manual de Crioconservación de Embriones para animales domésticos , para el laboratorio antes mencionado, para con esto tener un manejo confiable de los equipos.

El Primer Capítulo consta de la Introducción, revisión literaria acerca de todo lo que abarca la elaboración de un manual para laboratorio

El Segundo Capítulo explica la metodología usada para la elaboración de los manuales el sitio donde se usara el manual los recursos necesarios y las preguntas directrices practica de laboratorio y anexos.

El tercer capítulo el manuales desarrollado para el buen uso de los equipos, de acuerdo al esquema proporcionado por la dirección administrativa de la Universidad, las técnicas para la crioconservación de embriones.

Abstract

The reproduction Laboratory in the Veterinary Medicine career at the Technical University of Cotopaxi has equipment for practice under a teacher control and in accordance with the established standards for proper use. The goal of this paper is to develop a manual for embryo cryopreservation pets to be used within the lab in a trust full way.

The first chapter contains the introduction literature review about manual for lab development. The second chapter explains the methodology used for the production of manuals, their use places, the necessary resource and the main questions for the lab practices and its annexes. The third chapter covers the manual itself with tips for using the equipment properly according to the university regulations.

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de docente del centro cultural de idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi, yo Lic Msc. Edgar Encalada con C.I. 0501824171 **CERTIFICO** que he realizado la respectiva revisión del Abstract con el tema: ““MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES DE MAMÍFEROS DOMÈSTICOS EN EL LABORATORIO DE LA BIOTECNOLOGÌA DE REPRODUCCIÒN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.” 2013”, cuyo autora es la Señorita Gabriela Elizabeth Zambonino Bautista y director de tesis Dr. Cristian Arcos.

Docente:

.....

Lic Msc. Edgar Encalada T

C.I. 0501824171

INTRODUCCIÓN

El manual presenta técnicas específicas, señala el procedimiento a seguir para lograr el trabajo eficaz del estudiante dentro del laboratorio y tener las pautas necesarias para desarrollarse adecuadamente y aplicar las normas necesarias para el mantenimiento del laboratorio y para los resultados de las practicas sean eficaces y de gran ayuda para el estudiante el docente y la Universidad.

El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia; controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas; crear bancos de embriones de valor pecuario, entre otras. Los registros de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones revelan que más del 50% de 500.000 embriones de bovino transferidos en los últimos años han sido usados después de ser congelados y descongelados.

En la Universidad Técnica de Cotopaxi en el laboratorio de biotecnología de la carrera de Medicina Veterinaria no existen manuales de crioconservación de embriones, el cual permita aportar conocimientos a los estudiantes al momento de utilizar el laboratorio.

Los laboratorios no cuentan con investigación bibliográfica que requiere el alumno para poder desarrollar sus destrezas y habilidades de acuerdo al tema de estudio.

El propósito al realizar este manual es el de aportar a la universidad un manual adecuado para el laboratorio de biotecnología para la crioconservacion de embriones y al mismo tiempo el obtener el título de médico veterinario realizando el manual con la ayuda del docente tutor para que podamos alcanzar todos los objetivos planteados.

LOS OBJETIVOS FUERON.

General

Se pretende Elaborar un manual de crioconservación de embriones de mamíferos domésticos que aporte como una guía de estudio para el laboratorio de biotecnología de la universidad Técnica de Cotopaxi.

Especificos

- Estructurar el contenido del manual de laboratorio para la crioconservacion de embriones especificando el manejo del equipo, una técnica adecuada con los materiales al alcance del estudiante y de la Universidad. Determinar característica, funcionamiento y técnicas del equipo.
- Observar mediante el manual el uso correcto del equipo y el comportamiento en el laboratorio para el desarrollo de las prácticas dictadas de parte de los docentes a los estudiantes.
- Elaborar un plan de renovación que permita determinar con criterio económico la vida óptima de un equipo.

Contenido

CAPITULO I.....	1
1. REVISION DE LITERATURA.....	1
1.1. MANUALES.....	1
1.1.1. MANUAL DE FUNCION.....	1
1.1.2. LOS PRINCIPIOS GENERALES	2
1.2. TIPOS DE MANUALES	3
1.2.1. Organización.....	4
1.2.2. Departamental.....	4
1.2.3. Política	4
1.2.4. Procedimientos.....	4
1.2.5. Técnicas	4
1.2.6. Bienvenida	4
1.2.7. Puesto	4
1.2.8. Múltiple	4
1.2.9. Finanzas	4
1.2.10. Sistema	4
1.2.11. Calidad	5
1.3. PASOS PARA ELABORAR UN MANUAL.....	5
1.4. CONTENIDOS DE UN MANUAL.....	5
1.4.1. Partes componentes de un manual.....	5
1.5. DESCRIPCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	6
1.5.1. PORTADA	6
1.5.2. ÍNDICE	7
1.5.3. INTRODUCCIÓN.....	7
1.5.4. OBJETIVO DEL MANUAL	7
1.5.5. MARCO JURÍDICO.....	8
1.5.6. PROPÓSITO.....	8

1.5.7.	DOCUMENTO DE REFERENCIA	8
1.5.8.	REGISTROS	8
1.5.9.	GLOSARIO	9
1.5.10.	ANEXOS.....	9
CAPITULO II.....		10
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1.	Introducción	10
2.2.	Universidad Técnica de Cotopaxi.....	10
2.2.1.	Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (U.A.C.A.R.E.N).....	11
2.2.2.	Ubicación política geográfica	11
2.3.	Características del área (Laboratorio)	12
2.4.	RECURSOS NECESARIOS.....	12
2.4.1.	INSTITUCIONALES	12
2.4.2.	TALENTO HUMANO	12
2.4.3.	RECURSOS TECNOLÓGICOS	13
2.4.4.	MATERIALES	13
2.5.	MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	13
2.5.1.	MÉTODO DEDUCTIVO.....	13
2.5.2.	MÉTODO INDUCTIVO.....	13
2.5.3.	MÉTODO ANALÍTICO.....	14
2.5.4.	TÉCNICA DE FICHAJE	14
2.6.	METODOLOGIA	14
2.7.	DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	15
2.7.1.	PREGUNTAS DIRECTRICES	15
2.8.	PRACTICA DE CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES	16
2.8.1.	Marco teórico:.....	16
2.8.2.	Objetivo General:.....	16
2.8.3.	Objetivos Específicos:.....	17
2.8.4.	Materiales:	17
2.8.5.	Equipos	17

2.8.6.	Reactivos	17
2.8.7.	Procedimiento.....	17
2.9.	ANEXOS.....	18
CAPITULO III.....		21
3.	MANUAL.....	23
3.1.	INTRODUCCIÓN	23
3.2.	ANTECEDENTES	24
3.2.1.	Cultivo de Embriones.....	24
3.3.	PREPARACIÓN DEL LABORATORIO PARA REPRODUCCIÓN	25
3.3.1.	NORMAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN	25
3.4.	CARACTERISTICAS DE EQUIPOS.....	26
3.4.1.	CRYOLOGIC 5500.....	26
3.4.2.	FREEZE CONTROL.....	30
3.4.3.	FLUJO DE VACÍO CON PLACAS TÉRMICAS	35
3.4.4.	MICROSCOPIO CONTRASTE DE FASES	35
3.4.5.	Constitución del microscopio de contraste de fase	36
3.4.6.	ESTEREOMICROSCOPIO.....	40
3.5.	INSTRUMENTOS PARA RECOLECTAR Y MANEJAR EMBRIONES	43
3.6.	PRÁCTICA #1 COLECCIÓN DE EMBRIONES	46
3.6.1.	INTRODUCCIÓN.....	46
3.6.2.	OBJETIVOS	46
3.6.3.	COLECCIÓN DE EMBRIONES EN OVINOS.....	50
3.6.4.	COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CERDOS.....	51
3.6.5.	COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CAPRINOS.....	52
3.6.6.	COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CANINOS.....	53
3.6.7.	COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CUYES	54
3.6.8.	COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CONEJOS.....	56
3.7.	<i>PRACTICA #2</i> SELECCIÓN DE EMBRIONES.....	58
3.7.1.	INTRODUCCION.....	58
3.7.2.	OBJETIVOS	58

3.7.3.	SELECCIÓN DE EMBRIONES EN BOVINOS.....	59
3.7.4.	SELECCIÓN DE EMBRIONES OVINOS	60
3.7.5.	SELECCIÓN DE EMBRIONES PORCINOS	61
3.7.6.	SELECCIÓN DE EMBRIONES CAPRINOS.....	62
3.7.7.	SELECCIÓN DE EMBRIONES CANINOS	63
3.7.8.	SELECCIÓN DE EMBRIONES CUYES Y CONEJOS	65
3.8.	PRÁCTICA # 3 C RIOCONSERVACION DE EMBRIONES.....	66
3.8.1.	INTRODUCCION.....	66
3.8.2.	OBJETIVOS	66
3.8.3.	INTRODUCCION:.....	69
3.8.4.	OBJETIVOS	69
3.8.5.	Criopreservación con glicerol.....	70
3.8.6.	Criopreservación con etilenglicol	72
3.8.7.	CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES BOVINOS	73
3.8.8.	CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES OVINOS Y CAPRINOS	75
3.8.9.	Técnica de vitrificación	78
3.8.10.	CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES PORCINOS	79
3.8.11.	ETAPAS DEL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN	79
3.8.12.	CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CANINOS	81
3.8.13.	CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CUYES Y CONEJOS	84
4.	CONCLUSIONES.....	86
5.	RECOMENDACIONES	87
6.	BIBLIOGRAFIA	88
6.1.	Libros:.....	88
6.2.	Enlaces	88
6.3.	Sitios Web:.....	89
7.	ANEXOS	93

CAPITULO I

1. REVISION DE LITERATURA

1.1. MANUALES

1.1.1. MANUAL DE FUNCION

Según la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA (2012) especifica al manual de funciones que:

Es un instrumento de trabajo que contiene el conjunto de normas y tareas que desarrolla cada funcionario en sus actividades cotidianas y será elaborado técnicamente basados en los respectivos procedimientos, sistemas, normas y que resumen el establecimiento de guías y orientaciones para desarrollar las rutinas o labores cotidianas, sin interferir en las capacidades intelectuales, ni en la autonomía propia e independencia mental o profesional. (p.1)(Alvarez,1996).

Según ALPIZAR VILLEGAS 2008, albornoz (2011):

“Un manual de funcionamiento es el documento que contiene la descripción y operación de actividades que deben seguirse paso a paso para la utilización de las funciones, ya sea máquinas, equipos, implementos, que incluye además los factores ambientales o unidades que intervienen precisando su proceso de operación para evitar accidentes dentro del entorno de trabajo para así tener un correcto funcionamiento de los equipos”. (p.5)

De acuerdo con VILLAROEL (2009) manifiesta que: el objetivo principal de Manual de Procedimiento, Funcionamiento es:

“Proporcionar información que sirva de base para evaluar la eficiencia del sistema en el cumplimiento de sus funciones específicas, una vez finalizada la identificación y desarrollo de cada uno de los procesos y procedimientos” . (p. 1)

1.1.2. LOS PRINCIPIOS GENERALES

ORGANIZACIÓN DE LA NORMA ISO 17025.

La aplicación de la norma ISO/IEC 17025:2000 titulada “Requisitos generales para la competencia de laboratorio de calibración y ensayo”, tiene como propósito indicar la dirección que asegure la calidad del trabajo; en ella se establecen los criterios generales para el funcionamiento de los laboratorios de ensayo, incluyendo identidad legal, imparcialidad, independencia e integridad, competencia técnica, cooperación y obligaciones del laboratorio con sus usuarios. Esta norma facilita la cooperación entre laboratorios, así como entre organismos, y apoya el intercambio de información y experiencia (Moya, 2005)

Norma Internacional vigente ISO/IEC 17025:2000 "Requisitos generales para la competencia de laboratorios de calibración y ensayo", la cual asegura que se trabaje en conformidad con las normas ISO.

Los aspectos a tener en cuenta fueron los planteados en la norma, tales como:

Los requisitos de gestión, que abarcan: organización, sistema de gestión de la calidad, control de la documentación, revisión de solicitudes, licitaciones y contratos, subcontratación de ensayos, adquisición de servicios, reclamos, control de trabajos no conformes, acciones preventivas y correctivas, control de registro, auditorías internas y revisiones por la Dirección.

Los requisitos técnicos, que tienen en cuenta personal, instalaciones y condiciones ambientales, métodos de calibración y ensayo, validación de métodos, equipos, trazabilidad de las mediciones, manejo de muestras, manejo de los objetos de ensayo, aseguramiento de la calidad de los resultados e informe de los resultados.

Todo esto permitió la elaboración del manual de calidad, los manuales de procedimientos y las instructivas correspondientes a utilizar en el trabajo diario.

- a) Alcance
- b) Referencia de Normas.
- c) Términos y Definiciones.
- d) Requisitos Administrativos.
- e) Requisitos Técnicos.

Haciendo referencia a esta organización el alcance esta dado por el cumplimiento de los requerimientos solicitados en la norma, las referencia de las normas que se utilizan en la realización de cada ensayo para que certifiquen un procedimiento del mismo, los términos y definiciones usados deben estar completamente claros para el usuario, los requisitos administrativos como el sistema de calidad, el control de documentos entre otros están enteramente ligados a los auditores que realicen la certificación.

Los puntos bases para obtener una acreditación al momento de realizar la verificación por parte de los auditores siempre serán los Requisitos Administrativos dan enfoque más interdisciplinario referido a la parte económica, repartición de cargos, manejo de documentación y los Requisitos Técnicos solicitados en la 17025:

1.2. TIPOS DE MANUALES

Los manuales son textos utilizados como medio para coordinar, registrar datos e información en forma sistémica y organizada. También es el conjunto de orientaciones o instrucciones con el fin de guiar o mejorar la eficacia de las tareas a realizar.

Pueden distinguirse los manuales de:

- 1.2.1. **Organización:** este tipo de manual resume el manejo de una empresa en forma general. Indican la estructura, las funciones y roles que se cumplen en cada área.
- 1.2.2. **Departamental:** dichos manuales, en cierta forma, legislan el modo en que deben ser llevadas a cabo las actividades realizadas por el personal. Las normas están dirigidas al personal en forma diferencial según el departamento al que se pertenece y el rol que cumple
- 1.2.3. **Política:** sin ser formalmente reglas en este manual se determinan y regulan la actuación y dirección de una empresa en particular.
- 1.2.4. **Procedimientos:** este manual determina cada uno de los pasos que deben realizarse para emprender alguna actividad de manera correcta.
- 1.2.5. **Técnicas:** estos manuales explican minuciosamente como deben realizarse tareas particulares, tal como lo indica su nombre, da cuenta de las técnicas.
- 1.2.6. **Bienvenida:** su función es introducir brevemente la historia de la empresa, desde su origen, hasta la actualidad. Incluyen sus objetivos y la visión particular de la empresa. Es costumbre adjuntar en estos manuales un duplicado del reglamento interno para poder acceder a los derechos y obligaciones en el ámbito laboral.
- 1.2.7. **Puesto:** determinan específicamente cuales son las características y responsabilidades a las que se acceden en un puesto preciso
- 1.2.8. **Múltiple:** estos manuales están diseñados para exponer distintas cuestiones, como por ejemplo normas de la empresa, más bien generales o explicar la organización de la empresa, siempre expresándose en forma clara.
- 1.2.9. **Finanzas:** tiene como finalidad verificar la administración de todos los bienes que pertenecen a la empresa. Esta responsabilidad está a cargo del tesorero y el controlador.
- 1.2.10. **Sistema:** debe ser producido en el momento que se va desarrollando el sistema. Está conformado por otro grupo de manuales

1.2.11. Calidad: es entendido como una clase de manual que presenta las políticas de la empresa en cuanto a la calidad del sistema. Puede estar ligado a las actividades en forma sectorial o total de la organización (Bruce Silver, 2004).

1.3. PASOS PARA ELABORAR UN MANUAL

- a) Los pasos para hacer o elaborar un manual, de manera muy generalizada, para que los adaptes a tus necesidades particulares:
- b) Definir el tema: debes acotar el alcance o profundidad del manual, en el fondo lo que vas a cubrir, para no extralimitarte o hacerlo demasiado breve
- c) Relacionado con el punto 1, debes visualizar al lector objetivo al cual está dirigido el manual, para adaptar el lenguaje utilizado en el mismo y lo "técnico" de sus párrafos, a este lector o usuario.
- d) Define la estructura, en el fondo los temas a tratar, desde la introducción hasta los últimos consejos (es común una sección de FAQs o trouble-shooting como anexo).Directamente relacionado a esto se encuentra la necesidad de definir el medio de difusión: en las versiones impresas, en general se permiten párrafos más extensos y detallados que en las guías o manuales en línea, donde deberás ser más conciso y al grano, para evitar esos largos scrolls para bajar la pantalla.
- e) Toma manuales de temas similares, para tomar ideas y afinar la estructura, antes de comenzar.
- f) Redacta el manual, tomando en cuenta todo lo anterior, y luego pásalo a diferente personas que se ajusten a tu público objetivo, a ver si entienden bien el contenido, y toma sus recomendaciones, para elaborar así una versión final (Villegas,2006)

1.4. CONTENIDOS DE UN MANUAL

1.4.1. Partes componentes de un manual

- a) Los elementos que más interesan dentro de los integrantes de un manual son aquellos que serán objeto de consulta y que se encontrarán ubicados en lo que se denomina “cuerpo Principal” funciones, normas, instrucciones,

procedimientos, lineamientos. Dependiendo estos temas del tipo de manual de que se trate.

- b) En primer lugar comenzará el texto con una sección denominada “contenido”, donde se enunciarán las partes o secciones integrantes del manual. Esta sección será seguida de un “índice” en el que, al igual que todo texto, se indicará el número de página en que se localiza cada título y subtítulo. Es un índice numérico, cuyo ordenamiento respeta la secuencia con que se presentan los temas en el manual.
- c) Pero también puede existir un índice temático, en el que los temas se presentan ordenados alfabéticamente para facilitar su localización por este medio. Por lo general, el índice temático se ubica como última sección del manual.
- d) La tercera sección será la “introducción” en la que se explicará el propósito del manual y se incluirán aquellos comentarios que sirvan para proponer al lector y clarificar contenidos en los capítulos siguientes.
- e) La cuarta sección contendrá la “instrucciones para el uso del manual”. Esto es, explicará de qué manera se logra ubicar un tema en el cuerpo principal a efectos de una consulta, o bien en qué forma se actualizarán las piezas del manual, dada la necesidad de revisiones y reemplazos de normas y medidas que pierden vigencia o surgen nuevas necesidades a cubrir.
- f) La quinta sección es el “cuerpo principal”; es la parte más importante y la verdadera razón del manual(Cardenas,2001).

1.5. DESCRIPCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

A continuación se describen cada uno de los componentes del Manual de Procedimientos.

1.5.1. PORTADA

- a) Denominada también pasta o carátula.

- b) Esta deberá contemplar:
- c) Logotipo de la Secretaría representativo de la Institución.
- d) En la parte central superior anotar la denominación del área mayor de la cual depende la unidad administrativa que elabora el Manual.
- e) En la parte central de la hoja se señalará el título del documento y;
- f) En el ángulo inferior derecho se incluirá la fecha de elaboración (mes y año).
- g) La portada no deberá llevar ningún adorno que sobresalga como son: líneas de colores, fondo de color, etc., que rompa con la originalidad del documento.

1.5.2. ÍNDICE

En éste rubro se deberá describir la relación que especifique de manera sintética y ordenada, los capítulos o apartados que constituyen la estructura del manual, así como el número de hoja en que se encuentra ubicado cada uno de estos.

1.5.3. INTRODUCCIÓN

Se refiere a la explicación que se dirige al lector sobre el contenido del manual, de su utilidad y de los fines y propósitos que se pretenden cumplir a través de él.

En este apartado se señalará en forma clara y concisa, los antecedentes principales de la unidad responsable del manual, sus características, ámbito de acción y adscripción, sin profundizar en ellos. Asimismo, se debe mencionar con que estructura orgánica (vigencia) se está elaborando el manual. También se definirán las técnicas de difusión, implantación y actualización del instrumento y los responsables de estas actividades, así mismo se describirá la forma en que se encuentra estructurado el documento con el propósito de lograr una mejor y mayor comprensión del mismo.

1.5.4. OBJETIVO DEL MANUAL

Aquí se debe definir el propósito final que se persigue con la implantación del instrumento. La formulación del objetivo debe ser breve, clara y precisa, atendiendo a

las siguientes indicaciones: iniciar con un verbo en infinitivo; señalar el qué y para qué servirá el manual; evitar el uso de adjetivos calificativos, así como subrayar conceptos.

1.5.5. MARCO JURÍDICO

Constituye el fundamento, legal que faculta a una determinada unidad administrativa para establecer y operar mecanismos, procedimientos y sistemas administrativos con la normatividad vigente, congruente con la naturaleza propia del manual en el ámbito de su competencia.

1.5.6. PROPÓSITO

Es la condición o resultado cuantificable que debe ser alcanzado y mantenido con la aplicación del procedimiento, y que refleja el valor o beneficio que obtiene el usuario. El propósito debe redactarse en forma breve y concisa; se especificará los resultados o condiciones que desean lograr, e iniciará con un verbo en infinitivo y, en lo posible, se evitará utilizar gerundios y adjetivos calificativos.

1.5.7. DOCUMENTO DE REFERENCIA

Son aquellos documentos que son requeridos para poder llevar a cabo el procedimiento, y que sirven para tener un mejor entendimiento del mismo o completar su ejecución.

1.5.8. REGISTROS

Documentos o elementos que servirán de evidencia de la relación de nuestras actividades. Se deben relacionar los formatos que sirven de evidencia, describiendo brevemente su aplicación, interpretación y uso:

- a) Registro: Se anotará el documento utilizado y generado en las actividades del procedimiento.

- b) Tiempo de conservación: El lapso en que permanece vigente el registro.
- c) Responsable de conservarlo: Persona o área señalada en la descripción del procedimiento.
- d) Código registro o identificación única: Es el código asignado al documento utilizado o general en las actividades del procedimiento.

1.5.9. GLOSARIO

Consiste en la definición de la terminología técnica utilizada en el texto del documento. El glosario, presentado por orden alfabético, proporciona elementos para una adecuada comprensión del mismo, facilitando su consulta, deberá presentarse en cada procedimiento.

1.5.10. ANEXOS

Documentos que nos sirven como complemento para la aplicación del procedimiento, y que se utilizan o generan durante las actividades del procedimiento (UNAM, 2004)

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Introducción

El Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos, perteneciente a la Carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Técnica De Cotopaxi, realiza pruebas valorativas a los productos alimenticios, para realizar esto es necesario el uso de equipos óptimos y funcionales por lo que cada uno de los equipos mencionados en el contexto del presente trabajo fueron sometidos a pruebas de funcionamiento mediante la aplicación de los mismos en prácticas de laboratorio, las cuales sirvieron para demostrar que estos equipos están en perfectas condiciones.

2.2. Universidad Técnica de Cotopaxi

En Cotopaxi el anhelado sueño de tener una institución de Educación Superior se alcanza el 24 de enero de 1995.

Grafico N° 1

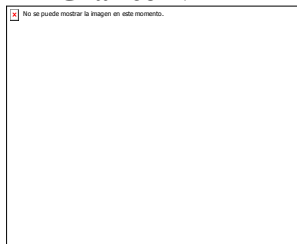


IMAGEN N° 3. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

2.2.1. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (U.A.C.A.R.E.N)

La Universidad Técnica de Cotopaxi, en su afán de responder a las exigencias de una eficiente formación profesional en este caso concreto en el campo de las Ciencias Agrícolas, Veterinaria, Ambientales y de Ecoturismo, mediante la vinculación del proceso enseñanza aprendizaje al proceso productivo, se adquirieron dos haciendas, donde funcionan los predios universitarios.

2.2.2. Ubicación política geográfica

División Política

País:	Ecuador
Provincia:	Cotopaxi
Cantón:	Latacunga
Parroquia:	Eloy Alfaro
Sector:	Salache

Situación Geográfica

Longitud:	78°37'19,16" E
Latitud:	00°59'47,68" N
Altitud:	2703,04 msnm

Condiciones Climáticas

Humedad relativa promedio: 59%

Temperatura máxima: 28 °C

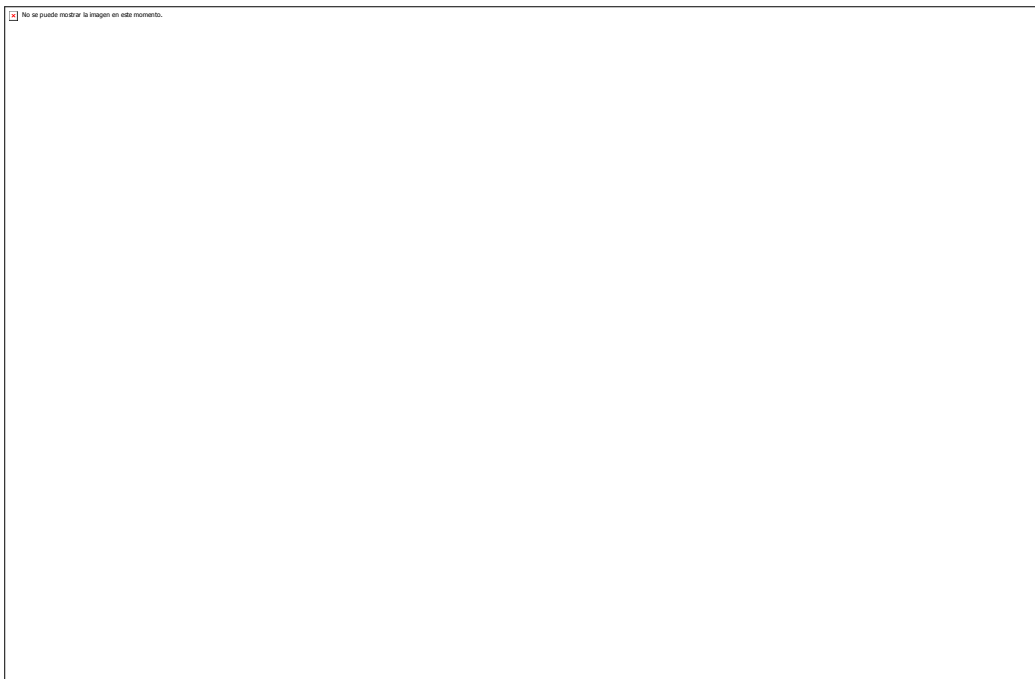
Temperatura mínima: 10 °C

Fuente: http://www.guiarte.com/destinos/america-del-sur/población_ecuador_.html

2.3. Características del área (Laboratorio)

Gráfico N°2

CROQUIS DEL LABORATORIO



2.4. RECURSOS NECESARIOS

2.4.1. INSTITUCIONALES

- Universidad Técnica de Cotopaxi

2.4.2. TALENTO HUMANO

- Postulante: Gabriela Zambonino
- Tutor: Dr. Cristián Arcos

2.4.3. RECURSOS TECNOLÓGICOS

- Computadora
- Impresora
- Flash memory
- Copiadora
- Internet

2.4.4. MATERIALES

- Hojas
- Libros de referencia para la investigación
- Fichas o libros de campo
- Útiles de oficina

2.5. MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.5.1. MÉTODO DEDUCTIVO

Este método parte o está enfocado para obtener las conclusiones de casos particulares, modelos teóricos, la explicación y abstracción, antes de recoger datos empíricos, hacer observaciones o emplear experimentos.

En la presente investigación se utilizará el método para establecer una observación detallada de cada uno de los procesos con el fin de lograr resultados verdaderos en la elaboración del proyecto.

2.5.2. MÉTODO INDUCTIVO

Inducción.- Es un modo de razonar que nos lleva:

a) De lo particular a lo general.

b) De una parte a un todo.

Se aplicará en la presente investigación en la esquematización del equipo y la técnica específica, es decir, de los pasos necesarios para la utilización del equipo.

2.5.3. MÉTODO ANALÍTICO

Es aquel método de investigación que consiste en la desmembración de un todo, descomponiéndolo en sus partes o elementos para observar las causas, la naturaleza y los efectos. Este método nos permite conocer más del objeto de estudio, con lo cual se puede: explicar, hacer analogías, comprender mejor su comportamiento y establecer nuevas teorías.

En esta investigación será uno de los métodos que mas utilizaremos, después de obtener datos del laboratorio, con esto podremos manejar de mejor manera la investigación.

2.5.4. TÉCNICA DE FICHAJE

El fichaje es una técnica auxiliar de todas las demás técnicas empleada en investigación científica; consiste en registrar los datos que se van obteniendo en los instrumentos llamados fichas, las cuales, debidamente elaboradas y ordenadas contienen la mayor parte de la información que se recopila en una investigación por lo cual constituye un valioso auxiliar en esa tarea, al ahorra mucho tiempo, espacio y dinero. En esta investigación aplicara en fichas técnicas de los equipos del laboratorio.

2.6. METODOLOGIA

En esta metodología se realizará la revisión bibliográfica y recopilación de información la misma que será útil para realizar los manuales, se puede definir como la descripción, y la valoración crítica de los métodos de investigación.

La metodología es el instrumento que enlaza el sujeto con el objeto de la investigación, Sin la metodología es casi imposible llegar a la lógica que conduce al conocimiento científico.

2.7. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

2.7.1. PREGUNTAS DIRECTRICES

¿Cómo ayudará el MANUAL DE CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES DE MAMIFEROS DOMESTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI, en el aprendizaje de los estudiantes de la carrera De Medicina Veterinaria ?

El manual ayudara proporcionando información referente al tema, para los estudiantes permitiendo ser un manual de gran ayuda para las prácticas en el laboratorio ya que se recopilo información de diferentes autores.

¿Cómo beneficiará el manual al ofrecer información de los equipos y la técnica en el laboratorio para desarrollar de las prácticas didácticas por los estudiantes de la Carrera de Medicina Veterinaria?

Será de gran beneficio ya que se proporciona información del funcionamiento, vida útil de los equipos para el uso correcto del mismo e información clara de técnicas para la colección, selección y criconservación de embriones.

¿Cómo beneficiará el manual de funcionamiento, técnica y mantenimiento del equipo?

El manual se recopiló información relevante de los equipos al usar en el laboratorio y las técnicas más utilizadas para la criconservación.

¿Permitirá ayudar mediante los manuales a realizar las prácticas con los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria?

Si servida y de gran ayuda ya que se proporciona información específica de las técnicas para cada especie doméstica haciendo de este manual una herramienta para el estudiante en el laboratorio.

2.8. PRACTICA DE CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES

Tema: Criconservación de Embriones Bovinos

Fecha: 21 de Octubre del 2013

En esta práctica se realizara la técnica de criconservación de embriones con muestras de bovinos, obtenidos del camal de Saquisilí los mismos que fueron observados y congelados utilizando los equipos que se encuentran instalados en el Laboratorio de la Biotecnología de Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

2.8.1. Marco teórico:

La criopreservación de embriones se ha transformado en una práctica importante dentro de los métodos de reproducción asistida en diversas especies animales

Objetivos:

2.8.2. Objetivo General:

- Crio conservar embriones bovinos.

2.8.3. Objetivos Específicos:

- Conservar los embriones a temperaturas adecuada.
- Preservar embriones bovinos aplicando la técnica de criconservación para el mejoramiento genético.

2.8.4. Materiales:

- Jeringas de 5ml
- Tubos de ensayo
- Cajas de petri
- Pipetas
- Pajuelas
- Tapones (sealingplugs) for 0.25 cc
- Embriones de bovinos frescos – líquido folicular

2.8.5. Equipos:

- Centrífuga
- Cryologic 5000
- Tanque de nitrógeno líquido con sus canaletas

2.8.6. Reactivos- soluciones:

- Etilenglicol
- Nitrógeno líquido

2.8.7. Procedimiento:

1. Primero se recolecta los embriones en el camal ya que deben estar frescos hay que mantenerlos en una solución (suero fisiológico) a temperatura corporal.
2. Después hay que transportarlos hacia el laboratorio.
3. Una vez en el laboratorio limpiar y retirar los tejidos que rodean al ovario para facilitar el proceso de recolección de ovocitos.
4. Para recolectar el líquido folicular hay que hacerlo de los folículos secundarios y primarios más no de los terciarios ya que aquí no encontraremos ovocitos de buena calidad.; con el bisel hacia debajo de la aguja introducir en el folículo y extraer el líquido.

5. El líquido folicular extraído colocarlo en un tubo de ensayo por sus paredes.
6. Llevar el tubo de ensayo ya identificado hacia la centrífuga donde lo programamos a 170 rpm durante 3 minutos.
7. Luego de la centrifugación el sedimento (embriones) queda al fondo del tubo de ensayo se pasa el contenido a una caja de petri se observa al microscopio para poder seleccionar de acuerdo a la calificación Tipo A, B, C, D.

2.9. ANEXOS

Grafico 3 Extracción de embriones I



Gráfico 4. extraccion de embriones II



Grafico5 Extracción de la muestra

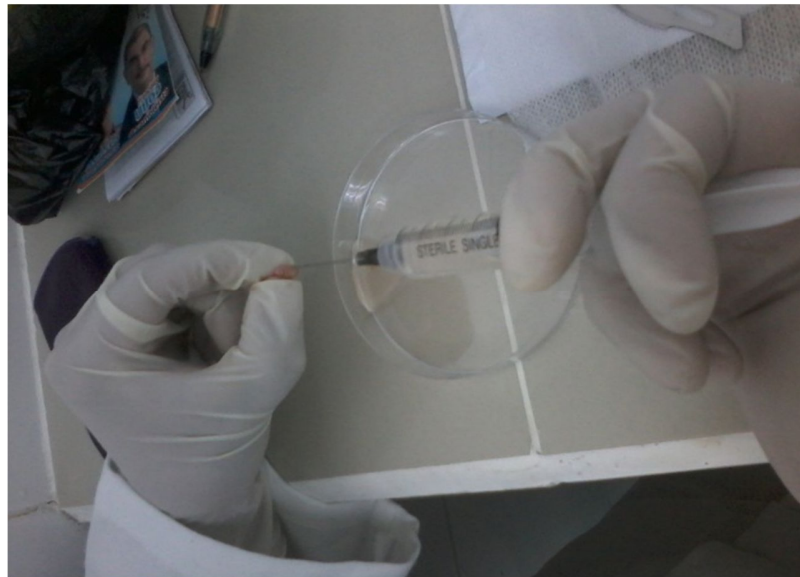


Grafico 6 Observación de la muestra



Gráfico 7 Ubicación de las muestras



CAPITULO III

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**“MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES DE MAMÍFEROS
DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE LA BIOTECNOLOGÍA DE
REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.”**

ELABORADO POR:

GABRIELA ZAMBONINO

DIRECTORIO

ING. MSC. HERNÁN YÁNEZ ÁVILA

RECTOR

DR. MS.C. ENRIQUE ESTUPIÑÁN

DIRECTOR ACADÉMICO UA-CAREN

DR. CRISTIAN ARCOS

DIRECTOR DE TESIS

3. MANUAL

3.1. INTRODUCCIÓN

El presente manual contiene la información básica necesaria acerca de la criconservación de embriones, aplicable al proceso para prácticas en el laboratorio de Biotecnología la cual se emite con la finalidad de servir de orientación y guía a los estudiantes el momento de utilizar los equipos del laboratorio.

El laboratorio deberá estar dotado de todos los equipos requeridos para proveer las prácticas de biotecnología ofrecidas incluyendo toma de muestras, preparación y procesamiento, almacenamiento.

Justo al final del siglo XX e inicios del siglo XXI, la reproducción animal, la biología celular y el mejoramiento genético han entrado a una nueva era, en la cual se tienen las herramientas necesarias para una multiplicación rápida de animales, por la implementación de nuevas técnicas reproductivas como son: la producción *in vitro* (PIV) de embriones, multiplicación de embriones por bipartición y clonación, así como también el sexado de embriones y espermatozoides, sin desmeritar a las técnicas viejas de inseminación artificial y transferencia de embriones.

La PIV de embriones se puede utilizar especies de fauna silvestre en peligro de extinción, dentro de programas de conservación, en las que la aplicación de técnicas reproductivas *in vivo* es difícil, como es el caso de los cánidos y felinos, que son muy susceptibles al estrés por manejo.

La PIV de embriones requiere del desarrollo tecnológico en tres áreas: maduración de ovocitos, fertilización y cultivo de los embriones *in vitro*.

3.2. ANTECEDENTES

La producción de embriones es de gran importancia, ya que es la forma más segura de exportar e importar germoplasma. Además, los embriones son menos propensos que el semen o los animales mismos a abrigar patógenos. De esta manera se pueden preservar genotipos completos (Ríos, 2001). Otra ventaja de la producción de embriones es su incorporación en esquemas de evaluación genética y selección para el mejoramiento genético, mediante el MOET, en donde se puede disminuir el intervalo generacional y aumentar la intensidad de selección, por lo que el cambio genético se puede incrementar sustancialmente (Lohuiset *al.*, 1993). Pero también puede tener sus desventajas, principalmente en la evaluación de efectos maternos, ya que la donadora no cría a su propio descendencia, y por lo tanto el comportamiento de la progenie no contribuye directamente a la predicción de la habilidad materna. También es importante señalar que la habilidad materna de las hembras receptoras puede enmascarar los efectos genéticos de la progenie y de la donadora. Con la utilización de la PIV de embriones se ha encontrado la aparición de un síndrome, denominado el síndrome del becerro pesado, el cual parece estar asociado a la inclusión de suero en el medio de cultivo, aunque se desconoce el componente activo que lo causa (Ríos, 2001).

3.2.1. Cultivo de Embriones

Existen 2 sistemas de cultivo de embriones: el sistema de cultivo *in vivo* y el sistema de cultivo *in vitro*.

- a) **Cultivo *in vivo* de embriones.** La utilización de oviductos de conejas como un sistema de cultivo *in vivo* se ha visto que es efectivo para el desarrollo de las primeras etapas de los embriones (Gordon y Lu, 1990; Sirardet *al.*, 1985b).

También se han utilizado borregas en lugar de conejas, en las que también se ha visto favorecido el desarrollo de los embriones (Eyestoneet *al.* 1987). En la

borrega usualmente se introducen cientos de cigotos de bovinos dentro de un oviducto ligado unas cuantas horas después de la ovulación, la cual es generalmente controlada por progestágenos y gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, por sus siglas en inglés). La cantidad de embriones recuperados es muy variable, y depende de factores del animal y experiencia del técnico (Gordon y Lu, 1990).

- b) **Cultivo *in vitro* de embriones.** Para replicar las condiciones naturales del microambiente del oviducto, se han desarrollado dos sistemas para el cultivo *invitro* de embriones, que son: la utilización de medios definidos para cultivo de embriones (KSOM, CR1aa, CR2, TCM-199, CZB, SOF, USU, Ham F-10, Menezob, etc) y la utilización de co-cultivos. En este último caso existen diferentes tipos celulares: células de la granulosa, células epiteliales de oviducto de bovino (BOEC, por sus siglas en inglés), y líneas celulares establecidas (células Vero), etc. (Marquant-Leguienne y Humblot, 1998).
- c)

3.3. PREPARACIÓN DEL LABORATORIO PARA REPRODUCCIÓN

3.3.1. NORMAS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN Esterilidad y Limpieza

- a) Toda la cristalería, artículos de plástico y medios utilizados deben estar estériles.
- b) Hay que utilizar técnicas estériles cuando se manejen los medios.
- c) Siempre hay que limpiar todas las superficies con un trapo o limpiador empapado con etanol al 70%. **Otros consejos (“tips”)**
- d) La punta de la pipeta puede contener toxinas u otras sustancias que pueden inhibir el desarrollo de los embriones. Como precaución, siempre hay que llenar y vaciar la punta de la pipeta por lo menos una vez antes de

usarse, especialmente antes de adicionar un nuevo medio o suero a una microgota que contiene embriones.

- e) Cuando se transfieran ovocitos o embriones de un medio a otro, hay que transferirlos en tan poco medio como sea posible.
- f) Las aperturas repetidas de la puerta de la incubadora provocan que la temperatura en el frente de la incubadora fluctúe. Se recomienda colocar los platos en el fondo de la incubadora para reducir la exposición a cambios de temperatura.

3.4. CARACTERISTICAS DE EQUIPOS

3.4.1. CRYOLOGIC 5500

Cryologic es una compañía australiana enfocada en diseñar, desarrollar y manufacturar instrumentos que combinan alto rendimiento, alta calidad y destacada confiabilidad combinados con sencillez.

Cryologic tiene una política de continuar desarrollando y actualizando sus productos para asegurar que estos mantengan excelente tecnología, prácticos para el uso y apropiados en un mundo cambiante en ciencia y tecnología.

La compañía fue establecida en 1985 y en la actualidad es una de las líderes en manufactura de sistemas de Criopreservación con redes de distribución en más de 80 países. El éxito de Cryologic proviene de una mente innovadora, un compromiso con la calidad y la excelencia y con el servicio al cliente.

Los sistemas del **CONTROLADOR DE CONGELAMIENTO** poseen una velocidad controlada, los congeladores a base de nitrógeno están diseñados precisamente para la Criopreservación de especímenes biológicos. El sistema del **CONTROLADOR DE CONGELAMIENTO** provee un método patentado y confiable para la regulación de temperatura y transferencia de calor durante el

congelamiento de material biológico para largos períodos de preservación y una recuperación viable.

Los usuarios seleccionan del rango de temperaturas controladas y de la crio cámara para configurar al sistema de forma que puedan obtener sus específicos requerimientos.

Los sistemas del Controlador de Congelamiento poseen un diseño modular y sus partes son intercambiables.

- Cada sistema consiste en un Controlador de Temperatura, una Crio Cámara y una Crio Tina.
- La Crio Cámara permanece en contacto directo con el nitrógeno líquido en la Crio Tina.
- La Crio Cámara está conectada con el Controlador de Temperatura, el cual regula la temperatura de especímenes biológicos.
- Ninguna instalación especial es requerida: los sistemas pueden ser configurados rápidamente y empaquetados por el usuario.

Precisión

- Su único diseño, permite que la temperatura sea más precisa y verazmente mantenida en términos económicos.
- Menos consumo de nitrógeno líquido y energía.
- Mínimos requerimientos de mantenimiento. Así que lo mínimo mantiene el costo.

Seguro y silencioso

- No posee componentes magnéticos, ventiladores o válvulas con partes móviles

Opciones de energía

- Fuente de poder universal.

- El sistema puede también ser usado para un determinado paquete de energía.

Fácil de usar

- Simple de operar.
- Posee una interfase para el usuario para controlar todas las temperaturas.

Portátil

- Compacto y de liviano peso, fáciles de mover de un lugar a otro y fácil de transportar.

Protocolos de temperatura

- Los protocolos de temperatura pueden ser pre-instalados en una tarjeta de memoria interna.
- Los protocolos de temperatura pueden ser también desarrollados usando el programa de CryoGenesis.
- Los protocolos incluyen un rango de temperatura, frecuencia y duración. El programa final puede ser manejado manualmente o automático.

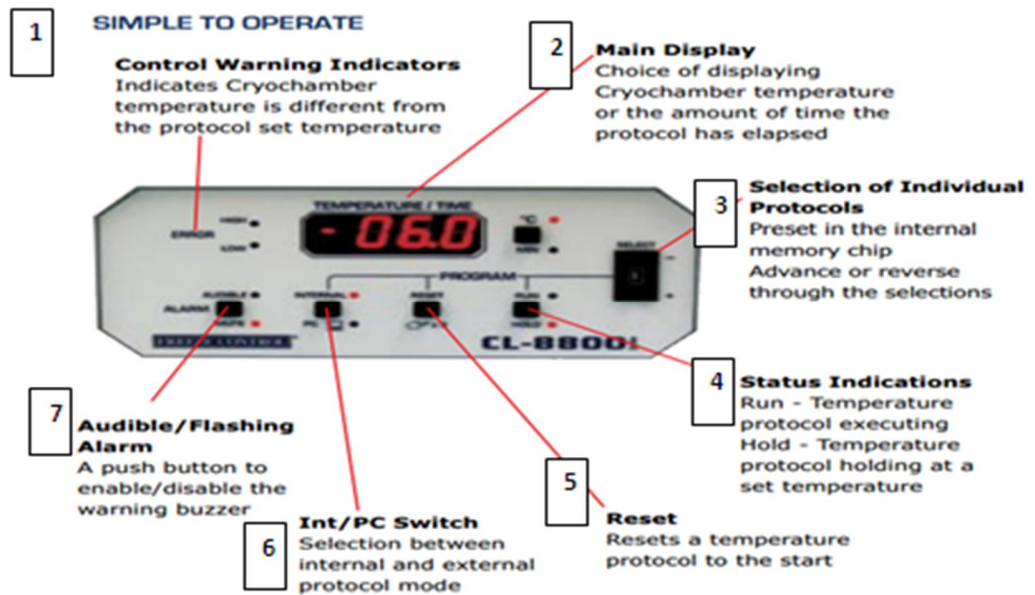
Siembra Manual

- El Sistema de Controlador de Congelamiento permite un acceso manual.
- Los especímenes pueden ser fácilmente accesados levantando el asa, sin exponerlos a fluctuaciones de temperatura.
- El centro conductor de la crío cámara y el acople hermético entre los especímenes y el centro asegura que el calor latente sea eficientemente removido durante el proceso de nucleación.

GRAFICO 8 Siembra manual



GRAFICO 9 Operador Simple de Criologyc (Guandiach, 2003)



1. Control para Indicador de Peligro: Indica que la temperatura de la crío cámara es diferente al protocolo establecido.
2. Pantalla Principal: escoja la visualización de la temperatura de la crío cámara o del tiempo del protocolo que ha transcurrido.
3. Selección de protocolos individuales, posee una tarjeta interna. Pudiendo adelantar o retrocederá través de las selecciones.
4. Indicación de Estado:
 - a. Ejecutando, temperatura del protocolo en ese rato ejecutándose.
 - b. En Espera, la temperatura del protocolo se mantiene en una temperatura fija.
5. Reiniciar: reinicia la temperatura del protocolo para poder comenzar.
6. Interruptor: seleccionar entre el modo de protocolo interno o externo.
7. Alarma: botón para habilitar o deshabilitar el timbre de alarma.

3.4.2. FREEZE CONTROL

GRAFICO 10 Criocámara Criologyc(Guandiach, 2003)



La Crío – Cámara es Única

- El diseño cilíndrico asegura una transferencia simétrica del calor de los especímenes hacia el nitrógeno líquido.
- La temperatura del espécimen está medido por un preciso sensor de platino para la temperatura, el cual se encuentra en el centro.
- La temperatura es constantemente monitoreada y regulada para mantener la temperatura del espécimen.
- La gran conductividad de los materiales usados en la crío – cámara aseguran un alto grado de precisión en la uniformidad de la temperatura de cada espécimen.

A. MEDIOS DE CRIOCONSERVACIÓN

Medios para el Cultivo de Embriones

En esta sección se describen algunos medios definidos (KSOM, CR1aa, CR2) para el cultivo de embriones. La utilización de co-cultivos con células de la granulosa se explica en el Apéndice A.

KSOM

Es un medio utilizado para el cultivo *in vitro* de los embriones.

1. Compre KSOM de un proveedor (disponible en Cell and Molecular Technologies) y almacénelo congelado. Úselo con cautela después de la fecha de caducidad proveída por el fabricante. Una vez descongelado, mantenga a 4°C por 2 semanas.

2. Para preparar una solución stock KSOM de 5 ml, adicione:
 - Seroalbumina bovina (SAB), AGELF- 15 mg (3.00 mg/ml)
 - Gentamicina (Solución Stock 8A) - 2.5 µl (0.5 µl/ml)
 - Aminoácidos No esenciales (100X) - 50 µl
 - Aminoácidos esenciales (50X) - 100 µl

3. Filtre estérilmente el medio a través de una jeringa con filtro de 0.22 µm dentro de un vaso de precipitado estéril de 10 ml. Úselo inmediatamente.

CR1aa

Este es un medio de cultivo alternativo para cultivo de embriones de bovino. La patente de este medio de cultivo pertenece al laboratorio Infingen de los Estados Unidos de América (<http://www.infingen.com>).

1. Elabore la solución stock CR1 (prepare en un matraz volumétrico de 100):
 - NaCl 0.670 g
 - KCl 0.023 g
 - NaHCO₃ 0.220 g
 - Piruvato de Na 0.004 g
 - Glutamina 0.015 g
 - Lactato Hemi-Ca 0.055 g

Adicione los primeros 5 ingredientes a una matr az volum etrico. Añada agua (solo 90 ml). Disuelva totalmente los constituyentes y agregue el Lactato Hemi-Calcio. Luego adicione el agua restante. Almacene hasta por 2 días a 4 C.

Nota: Los constituyentes de este medio se pueden precipitar en la solución. Para minimizar las posibilidades de que esto ocurra, hay que cerciorarse de que todos los constituyentes están disueltos antes de añadir el Lactato Hemi-Calcio y utilizar inmediatamente después de elaborado. Si un medio tiene una apariencia blanca o nublosa, hay que descartarlo y comenzar de nuevo.

2. Para preparar el CR1aa, hay que adicionar los siguientes ingredientes a los 5 ml de la *solución stock CR1*:

- Seroalbumina bovina (SAB), AGELF- 15 mg (3.00 mg/ml)
- Gentamicina (Solución Stock 8A) - 2.5 él (0.5 él/ml)
- Aminoácidos No esenciales, 100X - 50  l
- Aminoácidos esenciales 50X - 100  l

Filtre estérilmente el medio a través de un filtro de jeringa de 0.22  m dentro de un vaso de precipitado estéril de 10 ml. Fresco  sese inmediatamente o refrig rese.

Uso del medio CR1aa

1. El CR1aa debe ser hecho nuevo de una solución stock CR1 sacada del refrigerador. No refrigere la porción desrefrigerada sin utilizar.
2. Típicamente, los embriones son cultivados en microgotas de 5 ml de CR1aa cubiertas con aceite mineral (hay que utilizar aceite de Sigma probado con embriones o aceite pre equilibrado con agua para permitir que los compuestos embriotóxicos salgan del aceite). Para hacer las microgotas, pipetear 5 ml del medio CR1aa dentro del fondo de una caja Petri (se pueden preparar más de 9 gotas en una caja de petri de 150 mm).

Lentamente adicionar una capa del aceite mineral sobre las gotas y luego adicionar 45 ml de medio CR1aa a cada gota después de que el aceite ha sido adicionado. Pre equilibrar las gotas por 2 h a 38.5  C y 5% CO2 antes de adicionar los embriones.

3. Adicionar cerca de 30 embriones a cada gota, comenzando de 8 a 10 h después de la fertilización. Los embriones deben ser lavados exhaustivamente en la solución HEPES-TALP antes de colocarlos en las gotas.
4. En el día 5 después de la fertilización, adicionar 5 ml de suero fetal inactivado con calor a cada gota. Los blastocistos se pueden encontrar después del día 7 de fertilización.

CR2

Es un medio para cultivo de embriones más sencillo, que se muestran sus componentes a continuación.

Receta para la preparación de Medios TALP

Componentes Cantidades

NaCl 108.3 mM

KCl 2.9 mM

NaHCO₃ 24.9 mM

Lactato Hemi-Calcio 2.5 mM

Piruvato de Sodio 0.5 mM

Aminoácidos BME y Aminoácidos no esenciales MEM

Glicina 0.5 mM

Alanina 0.5 mM

Glutamina 1.0 mM

Glucosa 1.0 mM

Penicilina G 100 UI/ml

Estreptomicina 100 µg/ml

Seroalbumina bovina o Suero fetal bovino 6 mg/

Tipo y concentración de los compuestos crioprotectores.

Existen muchos alrededor del mundo, pero en general existen 2 categorías de crioprotectores:

Tipos Características Ejemplos

Intracelulares -Son de bajo peso molecular -Glicerol

- -DMSO
- -Son permeables al embrión -Etilenglicol
- -Propilenglicol

Extracelulares - Son de alto peso molecular

- Sucrosa(son azúcares y proteínas)
- Seroalbumina bovina
- Ácido hialurónico
- Polivinilpirrolidona(PVP)
- Son impermeables al embrión -Hidrosietilo de almidón (HES)
- Dextranos
- 1,2 propanadiol (PROH)
- Glucoproteínas de peces del antártico (congelan a -2.5°C)

Su efecto protector de los crioprotectores intracelulares se debe a factores como:

- a) Reducción del daño por el efecto de la solución y congelamiento intracelular;
- b) disminución de las temperaturas en las que ocurre el congelamiento intracelular; y
- c) estabilización del efecto sobre las membranas.

Se recomienda que un crioprotector intracelular tenga: alta solubilidad, baja toxicidad en altas concentraciones y bajo peso molecular.

Crioprotector Peso molecular (gramos)

Etilenglicol (EG) 62.07

Propilenglicol (PG) 76.10

Dimetilsulfóxido (DMSO) 78.13

Glicerol 92.10

(Adaptado de Gordon, 1994)

El mecanismo de acción de los crioprotectores extra celulares no se conoce, pero se cree que protegen a las células en el poscongelamiento, estabilizando la membrana celular.

Como regla, es más factible que un embrión sobreviva a la criopreservación cuando se utiliza una combinación de agentes crioprotectores que cuando se utiliza un solo agente.

3.4.3. FLUJO DE VACÍO CON PLACAS TÉRMICAS

El punto al vacío consistió en realizar nosotros en el laboratorio un flujo de vacío rudimentario ya que utilizando los siguientes materiales: un equipo de venoclisis, equipo de venoclisis de látex bovino y la bomba de vacío, tubo de ensayo y una jeringuilla 10 ml; nos permitió extraer el líquido folicular con presión de aire que provoca el flujo de vacío de una manera rápida.

Permite extraer el líquido folicular de los ovarios de una manera rápida utilizando el punto al vacío y aspirar los folículos que tengan una dimensión de 2 a 8 mm de diámetro.

Este flujo de vacío aplicado para obtener la mayor cantidad de ovocitos constituidos dentro del líquido folicular de los folículos.

3.4.4. MICROSCOPIO CONTRASTE DE FASES

¿Qué es el microscopio de contraste de fase?

El microscopio de contraste de fase (entre otros métodos más modernos), permite realizar exámenes inmediatos y observar células vivas. La microscopía de contraste de fase, fue desarrollada fundamentalmente por Zernike en 1932. Se basa

fundamentalmente en el retraso que se produce en las ondas de luz al atravesar objetos de distintos índices de refracción, aprovechando y amplificando dichos retrasos.

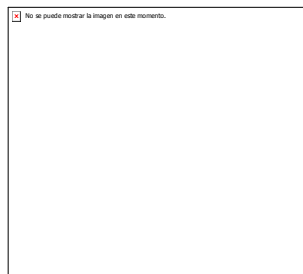
El microscopio de contraste de fase permite observar células sin colorear y resulta especialmente útil para células vivas. Este aprovecha las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una célula y en distintas partes de una muestra de tejido. La luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto al haz principal de ondas de luz que pasaron la muestra. Aparea otras longitudes de onda fuera de fase por medio de una serie de anillos ópticos del objetivo y del condensador, anula la amplitud de la porción fuera de fase inicial del haz de luz y produce un contraste útil sobre la imagen. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las porciones densas del espécimen; las partes claras de la imagen corresponden a porciones menos densas. Por lo tanto estos microscopios se utilizan para observar células vivas, tejidos vivos y cortes semi-finos no coloreados.

Dos modificaciones del microscopio de fase son el microscopio de interferencia y el microscopio de interferencia diferencial.

3.4.5. Constitución del microscopio de contraste de fase

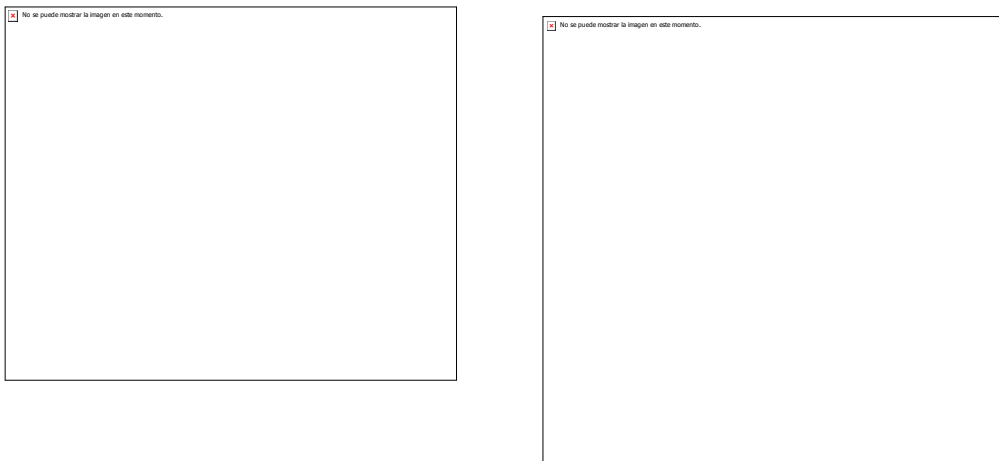
Fundamentalmente el microscopio de contraste de fase es un microscopio óptico de campo claro con algunas modificaciones, como objetivos y condensadores especiales.

***GRAFICO 11* Microscopio con sus condensadores especiales (Guandiach, 2003)**



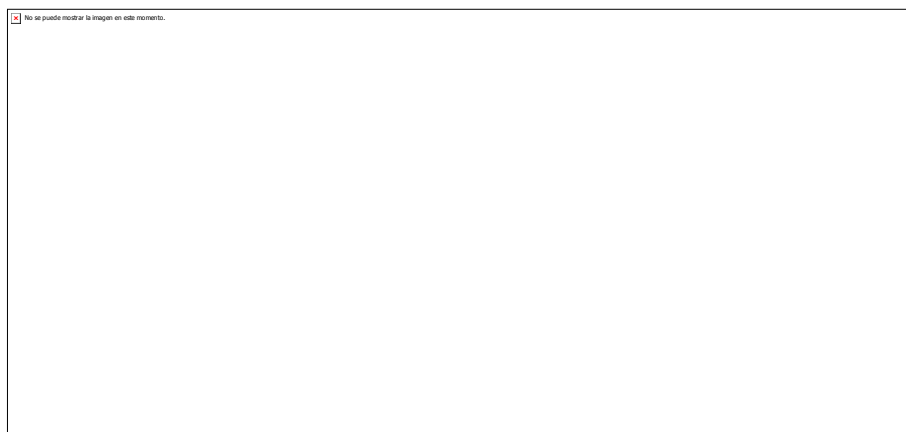
El condensador presenta un disco que proyecta un haz de luz con forma anular, y en la lente de salida de los objetivos, se agregan unos “anillos de fase”, que son discos transparentes con un diseño en relieve, cabe destacar que existen dos tipos diferentes de anillos de fase, denominados positivo y negativo, los cuales tienen distintos efectos sobre la luz y por lo tanto, las imágenes se ven diferentes en cada uno.

GRAFICO 12 Anillo de fase y condensador Disco de fase en un corte (Zernike F, 1966)



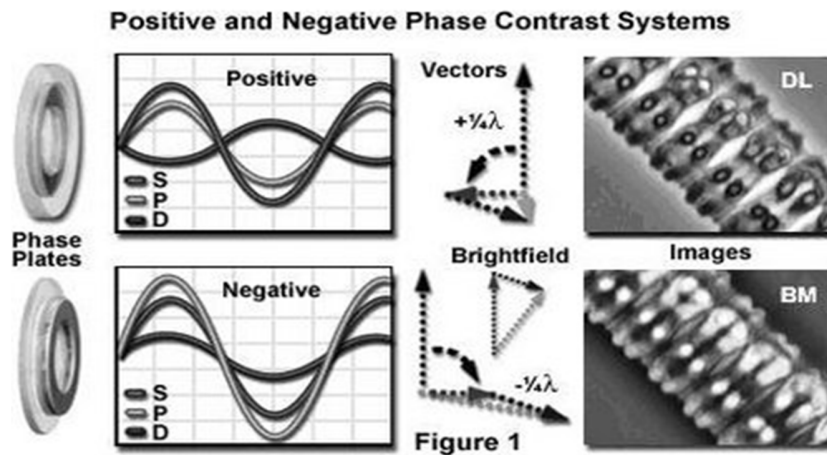
En la figura superior se muestra la ubicación del anillo de fase y el condensador anular en el microscopio. Además en la de la derecha, se muestra un corte de un objetivo, mostrando el disco de fase. Hay que considerar además que cada una de estas parte no es única, sino que existen varios juegos de condensadores y de objetivos, dependiendo de la ocasión y el zoom que se necesite.

GRAFICO 13 Fritz Zernike (1888-1966), la óptica de microscopio de contraste de fase y un microscopio moderno de contraste de fase. Se muestra una foto de Fritz Zernike (1888-1966) y el diseño de un microscopio de contraste de fase (Gundlach, 2003); Locquin, M y Langeron, M. 1985).



Además, existen distintas formas de discos de fase, positivos y negativos, los que tienen distintos efectos sobre la luz difractada, haciendo que las imágenes se vean de diferente manera dependiendo cual se use.

GRÁFICO 14 Sistemas de contraste de fase positivo y negativo (Locquin, M y Langeron, M. 1985)



Aplicaciones

El microscopio de contraste de fase, debido a sus propiedades, se utiliza para exámenes inmediatos (o *in vivo*), este tipo de microscopio ha desplazado en uso al de campo claro. Cabe destacar como desventaja, el que los objetos se vean delimitados por un halo o aura brillante alrededor en el caso del contraste de fase positivo, o por una sombra en el caso del contraste negativo, defecto producido por la manera de que se producen las imágenes. Aquí tenemos un ejemplo, varios paramecios conjugándose.

GRAFICO 15 Imagen de contraste positivo Gundlach, 2003y Imagen de contraste negativo Gundlach, 2003

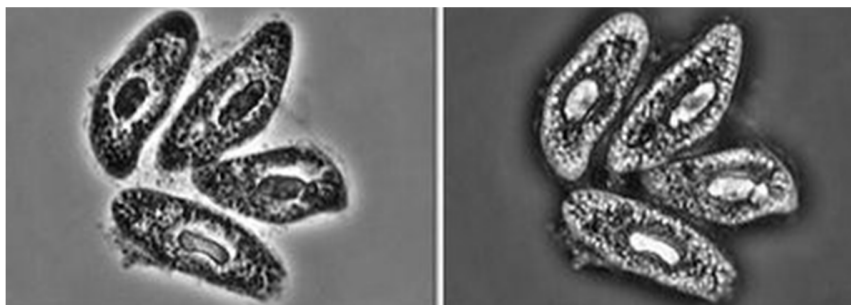
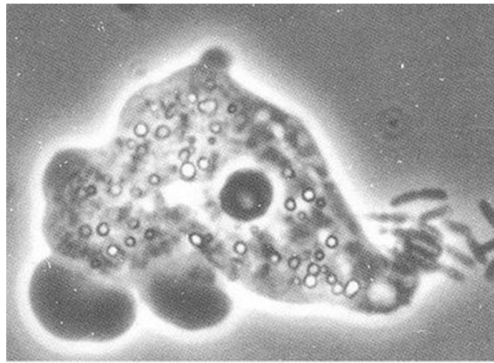


GRAFICO 16 Naegleriagrubert- trofozito visto con microscopio de contraste de fases Gundlach, 2003



3.4.6. ESTEREOMICROSCOPIO

El estéreo microscopio, o también conocido como lupa binocular, es un instrumento óptico que produce una imagen aumentada del objeto que se observa a través de ella. La lupa binocular forma una imagen de un tamaño aproximado de entre 20 y 40 veces mayor que el objeto que estamos observando. Este instrumento permite visualizar muestras opacas, tridimensionales y sin ningún tipo de preparación (minerales, pequeños insectos, objetos pequeños, etc.) Este pequeño estéreo microscopio ha estado diseñado para satisfacer todas las necesidades en ámbito didáctico o de aficionado.

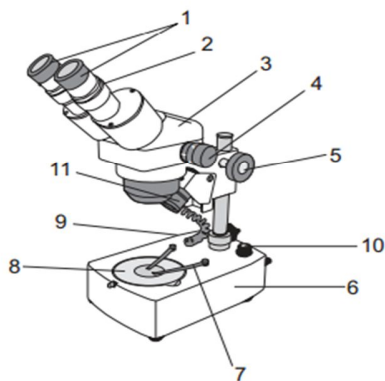
El estereomicroscopio debe manipularse siempre con cuidado evitando los movimientos bruscos, golpes, caídas de objetos pesados o punzantes, evitar el derrame de líquidos en su interior.

Para prevenir fuego o descargas eléctricas, evite los ambientes secos y polvorientos. Si esto ocurre, desenchufar inmediatamente el equipo de la toma de corriente.

Estos estereoscopios sirven para observar imágenes ampliadas de pequeños objetos siendo la imagen creada estereoscópica, no invertida y conservando el color original del objeto observado.

GRAFICO 17 Estereomicroscopio (Locquin M, 1985)

2. DESCRIPCIÓN



1. Oculares
2. Mando de ajuste dióptrico
3. Cabezal
4. Mando de control de zoom
5. Mando de control de enfoque
6. Base
7. Pinzas
8. Platina
9. Interruptor de encendido y apagado
10. Interruptor de iluminación incidente / iluminación transmitida / Iluminación incidente y transmitida
11. Iluminador incidente

- Base metálica muy estable
- Interruptor. Apagado/iluminación incidente/ iluminación reflejada.
- Iluminación: incidente y transmitida.
Incidente: halógena 6V 15W con control de intensidad.
Transmitida: halógena 6V 12W con control de intensidad.
- Platina; de vidrio esmerilado de 95mm, de diámetro para iluminación transmitida y de contraste blanco.
- Mandos de enfoque: bilaterales con sistema de enfoque por piñón y cremallera con parada de seguridad al final del recorrido.
- Mandos del zoom: bilaterales

- Cabeza binocular: inclinado a 45°. Distancia interpupilar ajustable.

Especificaciones ópticas

- **Oculares**
- **Zoom:** el zoom permite una adaptación continua del aumento sin que la imagen pierda nitidez. El mando del zoom modifica de forma continua el factor de aumento de 1X a 4X. la distancia de trabajo permanece invariable para todo el margen del zoom. Es operativo a ambos lados, con total para focalidad y centrado.

Instalación

- Coloque el estereomicroscopio sobre una mesa horizontal, plana y estable, creando un espacio libre al menos de 30cm por cada lado. No coloque el equipo e zonas próximas a fuentes de calor, ni lo exponga directamente a la luz del sol.
- Evite en el lugar de trabajo productos inflamables o tóxicos.

Elección de objetivos y oculares

La imagen observada pierde superficie y nitidez a medida que los aumentos son superiores.

Este incremento de aumentos debe obtenerse mediante objetivos cada vez más potentes y no a partir de oculares de mayor aumento, ya que el ocular sólo aumenta la imagen dada por el objetivo (cuanto más aumento tenga el ocular mayor es la pérdida de nitidez, claridad y superficie que presenta la imagen).

Para las observaciones rutinarias utilice los oculares de menos aumentos con objetivos más potentes. Los oculares de gran aumento se reservarán para casos particulares, teniendo presente el hecho de que disminuyen la definición y no incrementan la resolución.

3.5. INSTRUMENTOS PARA RECOLECTAR Y MANEJAR EMBRIONES

Uno de los aspectos claves para una PIV de embriones exitosa es la velocidad a la cual se realiza cada paso. La exposición de los ovocitos y embriones por periodos prolongados al aire a temperatura ambiente es detrimental para el desarrollo del embrión. La eficiencia en captar y manipular ovocitos y embriones es una actividad importante a aprender. Antes de comenzar la PIV por primera vez, se debe practicar con el instrumental hasta estar familiarizados con su uso.

Son varios los aparatos de diferentes laboratorios que se utilizan en la recolección y manejo de embriones, pero son tres los que tienen un uso amplio: Un micro dispensador y la micro pipeta “wiredrop”, producidos por Drummond, así como la micro pipeta capilar “unopette”, que es de Becton Dickinson. Se pueden obtener del laboratorio Fisher. Además, se pueden utilizar artículos fabricados en el laboratorio a partir de materiales como las pipetas Pasteur de vidrio estiradas.

GRAFICO 18

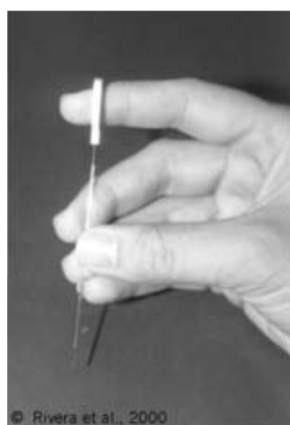


Algunos instrumentos usados para captar embriones y ovocitos. De izquierda a derecha: 1) Una jeringa de 1 centímetro cúbico (cc) con una extensión de tubo de hule conectado a una micro pipeta capilar “unopette”, 2) Una micro pipeta “wiredrop” (de Drummond Scientific), 3) Mismo artículo que en 1), pero sin la extensión de tubo de hule, y 4) Un micro dispensador Drummond de 5 μ l.

Sugerencias en el uso de instrumentos para manipular ovocitos y embriones

- a. Mantenga las puntas estériles. Antes de comenzar, limpie el barril del wiretrol o micro dispensador con etanol al 70%. Hay que asegurarse de que el etanol se evapore antes de comenzar el procedimiento. Los tubos capilares de la micro pipeta “wiretrol” y el micro dispensador Drummond ya están estériles cuando los surte el proveedor. Evite contaminación de la punta cuando la coloque en el micro dispensador. No toque con los dedos o con otras cosas no estériles la porción final de trabajo de la punta. Si está en duda su esterilidad, reemplace la punta, ya que son baratas.
- b. El aceite mineral puede ser un problema, ya que puede oscurecer el campo, dificultando la habilidad para visualizar los embriones. Evite regarlo alrededor de la gota de cultivo innecesariamente. Si el aceite es transportado en la punta durante el movimiento de embriones dentro de micro gotas, despeje el aceite agitándolo gentilmente en un posillo para medio vacío. Uno puede evitar succionar el aceite mineral dentro del micro dispensador al asegurarse de que el embolo está presionado cuando se saca el micro dispensador de una micro gota después de que un grupo de ovocitos o embriones ha sido colocado en ella.
- c. Si es posible, trate de aprender a pipetear con una mano, para que la otra mano pueda ser usada para controlar el plato. No es necesario para todos mantener una mano libre, así que se pueden utilizar las dos manos si se trabaja más cómodo.

GRAFICO 19



Uso de la micro pipeta “wiretrol” usando las dos manos (panel de la izquierda) o una mano (panel de la derecha).

- a) La micro pipeta capilar “unopette” está diseñado para embonar sobre una jeringa de 1 cc. Uno puede hacer una versión más sencilla de usar de la micro pipeta capilar “unopette”, colocando una pequeña pieza de tubo de hule entre la jeringa y dicha micro pipeta. Este tubo puede actuar como un bulbo para crear succión. Con la micro pipeta capilar “unopette” modificada, mantenga el embolo en la marca de 0.1 cc, para tener aire suficiente en el instrumento (Figura 6).

GRAFICO 20



Dos métodos para usar la punta de la micro pipeta capilar “unopette”.

El instrumento del panel izquierdo ha sido modificado para incluir una pieza de tubo de hule entre la micro pipeta capilar “unopette” y la jeringa, para dar al técnico mayor control sobre el volumen aspirado.

- b) Con la micro pipeta capilar “unopette”, hay que estar seguros de que los embriones no han sido succionados más allá de la porción del tubo capilar del instrumento, porque probablemente se perderán. Con la micro pipeta “wiretrol”, hay que tener cuidado de no jalar el embolo demasiado debido a que se puede salir mientras se recolectan ovocitos o embriones (cuando se está concentrado en recolectar embriones, es fácil olvidar cuanto volumen ha sido colectado).

- c) Cuando sea posible, no intente recolectar embriones bajo la influencia del alcohol.

3.6. PRÁCTICA #1 COLECCIÓN DE EMBRIONES

3.6.1. INTRODUCCIÓN

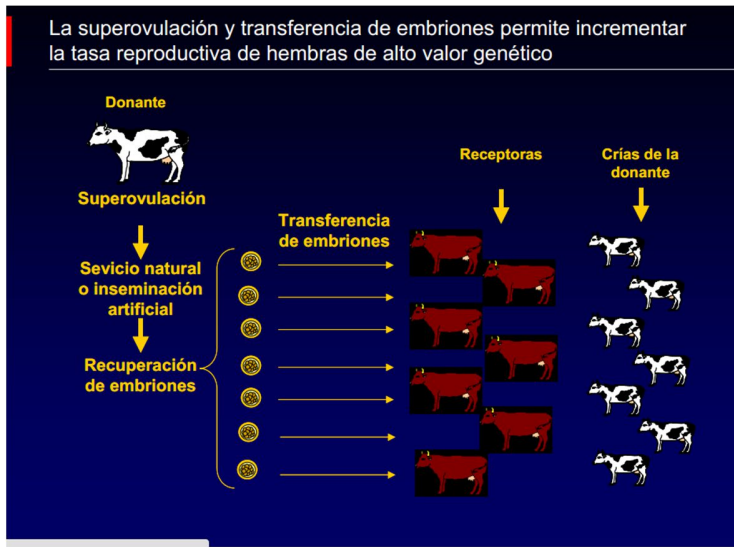
La colección de embriones ofrece grandes ventajas para el mejoramiento genético de los animales los cuales permitan el desarrollo tecnológico en una producción animal.

La implementación de esta tecnología permite acelerar la ganancia genética con la contribución de ambos sexos.

3.6.2. OBJETIVOS

- Conocer técnicas para la recolección de embriones.
- Determinar el momento adecuado para la colección.
- Desarrollar destrezas adecuadas para la colección de embriones

GRAFICO 21

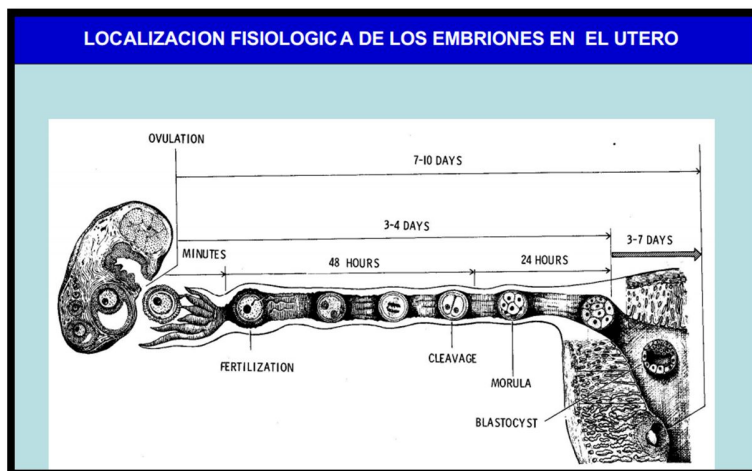


3.6.2.1. COLECCIÓN DE EMBRIONES EN BOVINOS

3.6.2.1.1. Materiales:

- Dilatador de cervix de acero inoxidable
- Catéteres de diferentes grosores:
 - De 2 vías
 - De 3 vías
- Sondas de obtención:
 - De caucho
 - De silicona
- Vainas sanitarias de IA
- Aislamiento de embriones:
 - Por decantación
 - Por filtración
- Posterior traslado a placas Petri de plástico
- Manipulación embrionaria con diferentes útiles de plástico o de vidrio
- Introducción en pajuelas de plástico para su congelación o TE

Gráfico 22 localización fisiológica de los embriones.

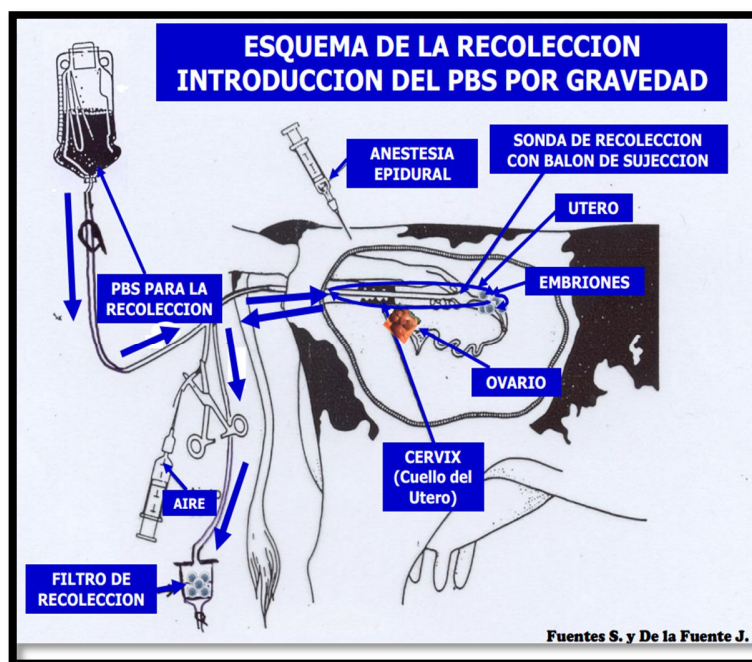


Fuentes S. y De la Fuente J.

Gráfico 23 esquema de recolección



Grafico 24 Esquema de recolección.



3.6.2.2. ELABORACIÓN DE MEDIOS

MEDIO BASE (LAVADO)= PBS

pH = 7,3+0,4; OSMOLARIDAD = 285 - 300 miliosmoles/Kg.

COMPOSICIÓN (D-PBS) para colectas:

1 L H₂O (Bidestilada) ó (Desionizada y Desmineralizada)

γCINa	8
γCIK	0,200
γCl ₂ Ca(2H ₂ O)	0,1325
γPO ₄ KH ₂	0,200

γCl ₂ Mg (6H ₂ O)	0,100
γPO ₄ Na ₂ H	1,150
γPiruvatoNa	0,36
γGlucosa.....	1
γPenicilina / Estreptomicina.....	100ui/100mg
o Sulfato de Kanamicina.....	25mg/li.
γOTROS: *Suero Fetal.....	1-2%
* ó BSA	0,2%

3.6.3. COLECCIÓN DE EMBRIONES EN OVINOS

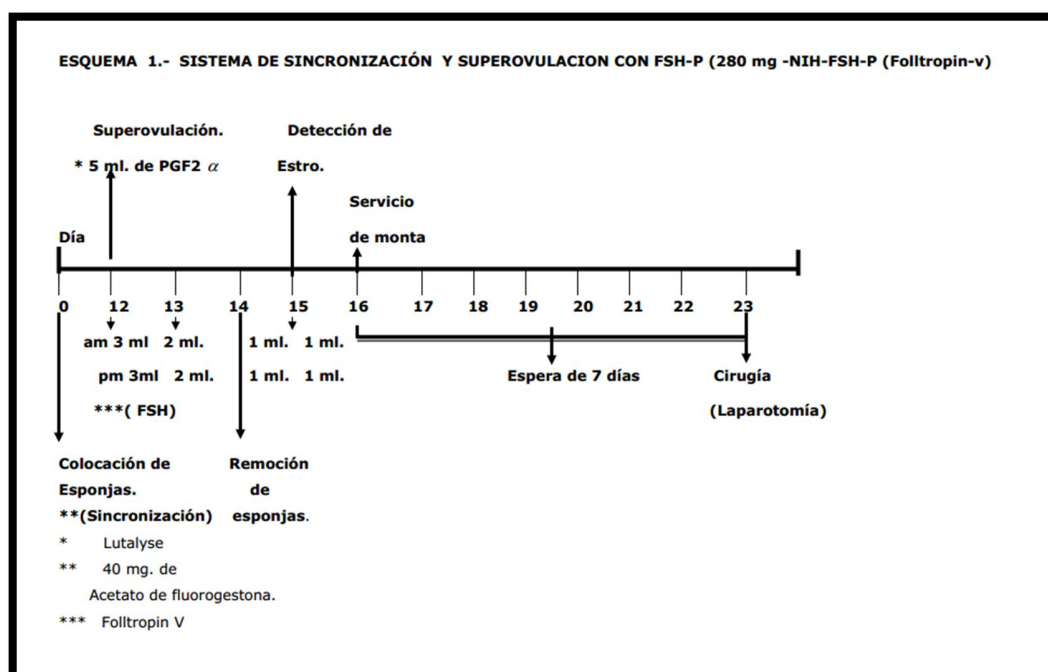
La colección de embriones se realiza del día 6 al 7 después de la aparición del servicio de monta en ovinos, por medio de lavados de los cuernos uterinos. En las cebras se realiza el día 7 u 8, ya que hay mayor porcentaje de blastocitos y el embrión se encuentra dentro de la zona pelúcida (baril, 1993).

La colección de embriones se puede ejecutar por distintos métodos: laparatomía, laparoscopia y por vía vaginal (Romano, 2002).

Laparotomía.- fue de las primeras técnicas utilizadas para la colección de embriones, para llevar acabo es necesaria la anestesia del animal, después de tener la zona de incisión desinfectada se procede a hacer una incisión de 8 a 10 cm sobre la línea alba delante de la ubre y se exterioriza los cuernos uterinos y se evalúan los ovarios. Se hace una punción en la base del cuerno uterino a nivel del ligamento intercornual para introducir la sonda folley (numero 8) en la luz uterina y se infla el globo para evitar la salida del líquido, en el extremo opuesto cerca de la unión utero-tubarica se realiza otra punción donde se coloca un catéter de 1-2 cm y se fija con un clamp

vascular para obstruir la luz. Se inyecta el líquido de colección (40-50 ml de PBS a 37 °C) en el extremo superior del cuerno y se colecta por el lado contrario, luego el líquido se coloca en un tubo falcón y se introduce en baño maría a 37°C . Después de realizar el lavado de ambos cuernos se introduce una solución con antibiótico (81 millón de UI penicilina) en la cavidad abdominal y se recomienda seguir con el tratamiento por vía sistémica por 3 días .

TABLA 1



3.6.4. COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CERDOS

El desarrollo de la tecnología presente crece rápidamente. Actualmente se evalúan diversos métodos quirúrgicos, semi-quirúrgicos y no quirúrgicos, a fin de definir el método más efectivo y practicable para la especie porcina. Que nos depara el futuro? En la actualidad se obtienen, por lo general, tasas de concepción de 60% y tasas de sobre-vivencia de embriones de 60% en hembras gestantes.

Eso significa, en resumen, que 35 a 40% de los embriones transferidos conducen al nacimiento de lechones. Estos resultados dejan lugar a futuros perfeccionamientos y, por de pronto, los criadores exigirán tasas de fertilidad superiores, para que la T.E. en porcinos sea aplicada a escala mundial.

Selección de embriones para transferencia. Maduración in vitro de ovocitos y embriones. Sincronización del celo entre donadoras y receptoras. Transferencia de embriones: Transferencia quirúrgica y no quirúrgica, selección y preparación de receptoras. Mantenimiento de la preñez después de la transferencia embrionaria.

3.6.5. COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CAPRINOS

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar que, si transfiriendo un embrión a Cabras previamente servidas por monta natural, mostrarían mejores resultados de fertilidad y prolificidad. Este trabajo se llevó a cabo en el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, ubicado en el km 14.5 de la carretera Iguala-Cocula, Gro. Se transfirieron embriones en estadio de mórula y blastocisto, calidades uno y dos, colectados el día 6 post estro. Se utilizaron 5 donadoras y 38 receptoras. Las receptoras fueron divididas en 3 grupos. Al grupo uno se asignaron 14 Cabras, las cuales siguieron el protocolo rutinario de transferencia embrionaria, a las 24, 36, 48 y 60 horas después del retiro de la esponja, se les dio monta natural, posteriormente, el día 6 post estro les fue transferido un embrión por laparoscopia en el cuerno uterino contrario al cuerno que mantenía el cuerpo lúteo (monta más un embrión).

El grupo dos quedó integrado por 8 hembras a las cuales se les transfirieron dos embriones de acuerdo al protocolo de transferencia rutinario (dos embriones). El tercer grupo fue integrado por 16 cabras, las cuales fueron sincronizadas solo para monta natural (solo monta). La fertilidad fue de 71.4 %, 75.0 % y 81.2 % para los grupos monta más un embrión, dos embriones y solo monta, respectivamente, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

3.6.6. COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CANINOS

Los embriones pueden extraerse de oviductos o úteros después de sacrificar a la hembra o por la extracción del aparato reproductor, o bien pueden recolectarse por medios quirúrgicos o no quirúrgicos del animal intacto.

Métodos quirúrgicos.

Aunque hay diferencias menores en las técnicas aplicadas a cada especie, el método básico para la recuperación quirúrgica de embriones es similar en todas las especies (Bowen y Pineda 1991).

La recuperación quirúrgica de embriones se lleva a cabo mejor con la donadora bajo anestesia general. Se hace una laparotomía y se exteriorizan ovarios y cuernos uterinos para lavarlos a través de una incisión en la línea media. Después de la recuperación de los embriones, el tracto reproductivo se vuelve a colocar en la cavidad abdominal y la incisión se cierra de manera estándar (Bowen y Pineda 1991).

La mayor desventaja de los métodos quirúrgicos para la recuperación de embriones es la inducción casi inevitable de adherencias periováricas, que pueden reducir la fertilidad subsecuente. Además del riesgo que conlleva la anestesia general (Bowen y Pineda 1991). Tsutsui y col (2000), utilizó perras donantes que fueron apareadas una vez al día, los días 2 a 5 después de la ovulación. Los días 8 a 11 después de la ovulación (los días 4–7 después de la cópula), ambos oviductos y el cuerno uterino fueron removidos quirúrgicamente bajo anestesia general. Los oviductos y los úteros removidos fueron lavados para recobrar los embriones. Otros perros fueron sometidos a laparotomía 10 o 11 días después de la ovulación (8 o 9 días después de la cópula). Los cuernos uterinos fueron lavados hacia abajo. Con una aguja de 21G conectada a una jeringa de 5 ml., fue introducida en la punta del cuerno uterino y 5 ml. de medio de lavados fueron inyectados hacia abajo (el método quirúrgico). El

medio de lavado usado para la recuperación de los embriones fue una solución Ringer suplementada con 20% de suero canino.

Métodos no quirúrgicos.

Se ha utilizado una variedad de instrumentos para la recuperación no quirúrgica de embriones; uno de los más exitosos es un catéter de Foley, que está hecho de látex flexible y tiene tres canales: uno para inflar el globo cerca de la punta del catéter y dos para la afluencia y colecta del medio de lavado. Se maniobra con el catéter a través del cérvix, el globo se infla justo cerca de la bifurcación uterina, y se irrigan los cuernos uterinos por separado. Una vez que el cuerno está irrigado, se desinfla el globo y el catéter se coloca en el otro cuerno uterino.

El medio utilizado para irrigar alimenta a través del canal de afluencia del catéter por flujo de gravedad de un recipiente suspendido, y el cuerno uterino se distiende hasta que se vuelve turgente. Entonces se interrumpe la afluencia, se abre el canal de desagüe y permite que el fluido acumulado drene hacia un cilindro de recolección. Se han observado pocos efectos adversos en este tipo de recuperación no quirúrgica, sobre la fertilidad de la donadora, después de varias recuperaciones no quirúrgicas (Bowen y Pineda 1991).

Una desventaja importante de la recuperación no quirúrgica, es que los embriones que se encuentran aún en el oviducto en el momento de la recolección no pueden ser recolectados (Bowen y Pineda 1991).

3.6.7. COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CUYES

La criobiología es el estudio de los procesos biológicos que ocurren durante la exposición a bajas temperaturas. Esta disciplina tiene sus fundamentos en principios físicos (temperatura y cambios de estado), químicos (composición de los crioprotectores) y biológicos (diferencias entre células, tejidos o especies). El proceso de criopreservación de embriones, tejidos o células consiste en descender la

temperatura fisiológica hasta temperaturas negativas (-196°C en el caso del nitrógeno líquido). El descenso de la temperatura altera los procesos biológicos normales y hace que el metabolismo sea más lento y que las membranas celulares se contraigan, poniendo en riesgo la integridad estructural de la célula. De esta forma, si la congelación no se produce en una forma controlada resultará en un deterioro irreversible, e incompatible con la vida de la célula. En particular, existe una zona de letalidad con temperaturas intermedias (-15 a -60°C) que la célula debe atravesar dos veces (congelación y descongelación) durante el proceso.

La deshidratación parcial de la célula es vital para evitar que el agua forme cristales de hielo durante la congelación. Por esta razón, se añaden al medio de congelación soluciones crio protectoras.

La función de estos compuestos es desalojar el agua de la célula, evitando así la cristalización por el frío. Los crioprotectores son de variada estructura química y se dividen en permeantes y no permeantes, dependiendo de su capacidad de atravesar la membrana celular por difusión pasiva. Dentro del grupo de los permeantes se encuentran el metanol, el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propilenglicol. Como ejemplo de crioprotectores no permeantes tenemos a los azúcares (rafinosa y sucrosa, en particular), la albúmina bovina y distintos polímeros sintéticos como el PVP, entre otros.

Los daños de la congelación se deben a dos tipos de procesos: (i) la formación intracelular de hielo y (ii) la concentración elevada de solutos debido a la precipitación del agua en forma de hielo. El primer caso se da cuando la congelación se produce demasiado rápido, atrapando el agua dentro de la célula. El segundo tipo de daño se produce cuando la congelación es demasiado lenta, lo que expone a las células a las altas concentraciones de soluto.

Cuando una solución comienza su congelación, se forman cristales de hielo y por lo tanto la concentración de la solución (relación entre moléculas de agua y moléculas de soluto en solución) aumenta.

3.6.8. COLECCIÓN DE EMBRIONES EN CONEJOS

El equipo de recolección de embriones es un grupo de técnicos capacitados para proceder a operaciones de recolección, tratamiento y conservación de embriones/ovocitos. El equipo comprende por lo menos un profesional experimentado.

Deberá reunir las siguientes condiciones:

- a) El equipo debe ser dirigido por un técnico profesional experimentado.
- b) El técnico profesional es responsable de todas las actividades del equipo que incluyen la inspección sanitaria de la colonia y del donante, la manipulación y cirugía de los donantes en condiciones sanitarias apropiadas y los procedimientos de desinfección e higiene. El técnico profesional rendirá cuentas al veterinario de la institución.
- c) El veterinario de la institución deberá ser certificado o acreditado en el cuidado de animales de laboratorio y contar con la autorización expresa para la recolección de embriones destinados a la exportación. Es responsabilidad del veterinario de la institución asegurarse de que se apliquen los procedimientos requeridos de tipificación sanitaria del estado de la colonia. Es responsable de certificar que los procedimientos de manipulación de embriones y las instalaciones de laboratorio son conformes a los requisitos establecidos en el presente capítulo.
- d) El personal del equipo deberá estar debidamente adiestrado para aplicar las técnicas y los principios de control de enfermedades y a utilizar técnicas asépticas en la manipulación de los embriones. El potencial zoonótico de los agentes patógenos específicos que afecten a las diversas especies de animales de laboratorio deberá identificarse y comprenderse a fin de evitar la contaminación de las colonias por medio de los vectores humanos y viceversa.

- e) Se deberán respetar reglas de higiene estrictas para evitar la introducción de infecciones en los animales donantes, colonias, instalaciones y equipos. Deberán tomarse disposiciones para impedir que el personal que entre en otras instalaciones de cría de animales pueda tener libre acceso a las instalaciones de recolección y manipulación de embriones.
- f) El equipo deberá trabajar en instalaciones adecuadas y disponer del material necesario para:
 - g) la recolección de embriones;
 - h) la manipulación y tratamiento de embriones en un laboratorio fijo o móvil;
 - i) el almacenamiento de embriones.
- j) El veterinario de la institución debe velar por la conservación de los registros completos de los animales y embriones, incluidos los registros de recolección, manipulación y almacenamiento de embriones. De ser aplicable, se usarán hojas de registro del tipo indicado en el Manual de la IETS2 para las especies ganaderas, y se indicarán datos tales como la identificación genotípica de los donantes, la gradación de la calidad embrionaria, el estadio morfológico. El equipo de recolección de embriones deberá llevar un registro de sus actividades que conservará durante por lo menos los dos años consecutivos a la exportación de los embriones para presentarlo a la Autoridad Veterinaria en caso de inspección.
- k) El equipo de recolección de embriones que participe en la exportación de embriones deberá estar autorizado por la Autoridad Competente y ser inspeccionado periódicamente por un veterinario oficial para asegurarse de que respeta las normas sanitarias durante la recolección, la manipulación y la conservación de los embriones.

3.7. PRACTICA #2 SELECCIÓN DE EMBRIONES

3.7.1. INTRODUCCION

La producción de embriones por las donantes y la transferencia a receptoras es el trabajo básico de la transferencia de embriones. El manejo de las donantes para maximizar la producción de embriones y el de las receptoras para tenerlas disponibles en el momento oportuno y para que tengan una buena fertilidad, forma parte de las tareas más importantes de la TE. La evolución hacia un sistema de manejo eficiente toma tiempo y paciencia y varía ligeramente de situación en situación.

Donantes

El manejo de las donantes es uno de los puntos críticos. Si estas hembras no están reproductivamente bien y en un adecuado estado de balance nutricional el programa puede fracasar antes de haber comenzado. Sólo ocasionalmente se deberá trabajar con vacas que carezcan de una óptima historia reproductiva o que tengan algún problema reproductivo determinado. Estos son casos especiales que no siempre se pueden rechazar y en los cuales las probabilidades de éxito son menores. En tales casos se debe prevenir al propietario sobre el mayor riesgo y el animal será tratado en relación con el problema detectado.

3.7.2. OBJETIVOS

- Determinar los embriones viables .
- Seleccionar los embriones de acuerdo a sus características.

3.7.3. SELECCIÓN DE EMBRIONES EN BOVINOS

Donantes

El manejo de las donantes es uno de los puntos críticos. Si estas hembras no están reproductivamente bien y en un adecuado estado de balance nutricional el programa puede fracasar antes de haber comenzado. Sólo ocasionalmente se deberá trabajar con vacas que carezcan de una óptima historia reproductiva o que tengan algún problema reproductivo determinado. Estos son casos especiales que no siempre se pueden rechazar y en los cuales las probabilidades de éxito son menores. En tales casos se debe prevenir al propietario sobre el mayor riesgo y el animal será tratado en relación con el problema detectado.

El manejo de la donante debe comenzar bastante antes de entrar en el programa y en esta etapa se deberá cumplir con el propietario para que comprenda y aprecie cómo debe ser manejada la vaca y cuál es su responsabilidad en ello. Por ejemplo, si la vaca irá a un Centro de TE es importante señalar al propietario la necesidad de establecer un seguro para la misma como se hace con un toro cuando va a un Centro de IA. Si la vaca tiene un ternero al pie, es conveniente que el mismo sea destetado o dejado con una vaca ama. Esto es particularmente importante si la donante es trasladada a un Centro de transferencia. No sólo importa por la salud del ternero sino también para el mejor rendimiento de la madre a quien, además del stress del cambio se suma el de la lactancia y cuidados del ternero.

Muchas vacas ciclarán en forma irregular en los dos primeros meses posparto si están bien nutridas y luego comenzarán a ciclar más regularmente. Otras no ciclarán mientras tengan su ternero al pie aun estando bien nutridas y esto no constituye una patología sino que es una respuesta natural en los mamíferos.

3.7.4. SELECCIÓN DE EMBRIONES OVINOS

La clasificación de los embriones se realiza en base a sus aspectos morfológicos y con 10a 40 aumentos. Una micro pipeta o una fina pipeta de vidrio permitirá mover los embriones, para poder observarlos desde distintos ángulos. Se debe observar la integridad de la membrana pelúcida y su esfericidad. El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera hasta un máximo de 24 horas de retraso (Figura 2). Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración. Se sugiere consultar la Blastografía del desarrollo embrionario temprano en el bovino súper ovulado (Atlas Embrionario–IMV). En algunos embriones, se puede observar desprendimiento parcial de células en el espacio perivitelino. Esta característica es tolerable si el resto conforma una masa celular uniforme y sin opacidad. Cuando los embriones son dudosos, se recomienda realizar una segunda observación a las dos horas. Este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presentan diferencias significativas en la sobrevivencia embrionaria (Bari y col, 2003) (Tabla 4) cuando se transfieren embriones de calidad regular respecto a la calidad buena o excelente (Anexo 1). Esta diferencia es mayor cuando se procede a la siembra de embriones que fueron congelados o vitrificados en nitrógeno líquido.

Tabla 2

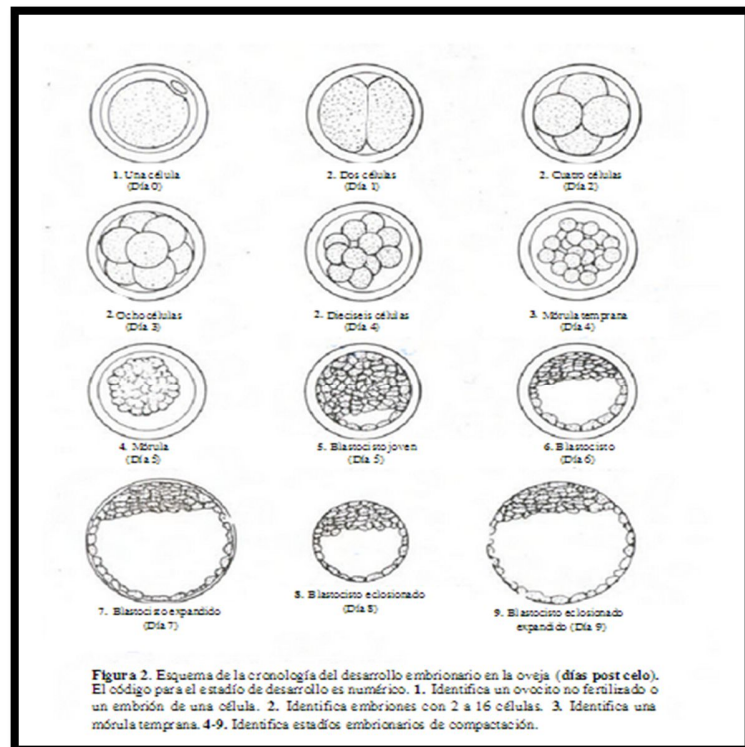
Grado embrionario	Embriones transferidos (n)	Sobrevivencia embrionaria (%)
Grado 1	825	75.6a
Grado 2	550	73.8a
Grado 3	114	61.4b
Grado 4	24	37.5b

Valores con diferente letra son estadísticamente significativos (test χ^2 ; $P < 0.05$)

La tasa de sobrevivencia embrionaria no es afectada por el día en que se realiza la colecta embrionaria (día 5 o 6 post estro). En los estadios embrionarios normales para los días correspondientes a su colecta (día 5, mórula; día 6, blastocisto) se presentan valores similares de sobrevivencia embrionaria ovina (74%) (Bari y col, 2003). Sin

embargo, blastocistos colectados en día 5 tienen una alta sobrevivencia respecto a mórulas retardadas colectadas en día 6

Tabla 3



3.7.5. SELECCIÓN DE EMBRIONES PORCINOS

El proceso de selección comprende tres etapas, en cada una de ellas las cerdas que no cumplan los requisitos son clasificadas como “No selectas” o de “oportunidad” y no se destinan a re productoras. En la preselección las cerdas que tienen buena morfología, aceptable desarrollo, adecuado nº de tetinas funcionales, y están libres de faltas y anomalías al final de la etapa de lechonerías entrarán a formar parte del lote que pasa a cría como futuras reproductoras

La 2ª preselección se debe hacer a los 140-150 días de vida, deben ser pesadas para determinar su GMD, que debe ser mayor de 600 gr/día para que pasen a la siguiente

fase. En la selección final el objetivo es obtener el n° preciso de nulíparas cíclicas en los 40 días siguientes, para lo que se necesitan que entren en esta fase de estimulación precoz el 125 % de nulíparas finalmente seleccionadas, ya que se puede esperar que un 22% no ciclen en esta fase de estimulación temprana y un 3% de eliminaciones por otras causas. Se recomienda que la inducción de la pubertad comience cuando las cerdas tengan 160 días de vida, y continúe hasta que exhiban su primer celo, o hasta los 190 días de edad.

La mejor forma de realizar esta estimulación es mediante contacto directo con el verraco al menos 15 minutos al día con un ratio nulíparas/verraco no mayor de 10

Cualquier cerdita que exhiba reflejo de inmovilidad entre los 160-190 días es seleccionada para el plantel de reproductoras. Si no es así se considera de oportunidad y es destinada a matadero

- -El 2° objetivo básico es la cubrición a un peso adecuado que no limite sus rendimientos reproductivos posteriores. Se recomiendan pesos a la primera cubrición mayores, de entre 135-150 kg
- -Por último, el tercer objetivo es minimizar la acumulación de días no productivos (DNP) en el lote de nulíparas. Para conseguirlo hay que ser muy riguroso en la selección, estimulación de la pubertad y en los pesos a la 1ª cubrición

3.7.6. SELECCIÓN DE EMBRIONES CAPRINOS

La selección de embriones se realiza en base a sus aspectos morfológicos. Una fina pipeta de vidrio permitirá mover los embriones, para poder observarlos de distintos ángulos. Se debe observar la integridad de la membrana pelúcida y su esfericidad. El embrión debe tener un desarrollo acorde con el día de colecta: se tolera hasta un máximo de 48 horas de retraso en el día 6to o 7mo, se debe descartar los embriones

de menos de 32 células. Las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración.

En algunos embriones, se puede observar desprendimiento de células en el espacio perivitelino. Esta característica es tolerable si el resto conforma una masa celular uniforme y sin opacidad. Cuando los embriones son dudosos, se recomienda realizar una segunda observación a las dos horas. Este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presenta diferencias significativas en el porcentaje de preñez cuando se transfieren embriones de calidad media o mediocre respecto a la calidad buena o excelente. Esta diferencia es mayor cuando se procede a la siembra de embriones que fueron congelados en nitrógeno líquido.

3.7.7. SELECCIÓN DE EMBRIONES CANINOS

Cualquier técnica en la que se utilicen embriones, incluso la congelación, implica obviamente su evaluación morfológica (Boggio 2002).

Las características morfológicas de los embriones en sus diferentes estadios de desarrollo, fue descrita por Linder y Wrigth (1983), tomando en cuenta esta descripción como base, Palma (2001) clasifica a los embriones bovinos de la siguiente manera:

TABLA 4

Estado de desarrollo	Número de blastómeras	Días de desarrollo posfecundación	Características generales
Mórula temprana	32-64	5	Blastómeras unidas, ocupan casi todo el espacio perivitelino.
Mórula compacta	32-64	6	Blastómeras unidas, ocupan el 60-70% del espacio perivitelino.
Blastocisto temprano	100-200	7	Aparece el blastocele (cavidad) en el interior del embrión, ocupa el 70-80% del espacio perivitelino.
Blastocisto	más de 200	8	Diferenciación evidente entre trofoblasto y el macizo celular interno. Ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
Blastocisto expandido	200-800	9	El diámetro del embrión aumenta considerablemente, se adelgaza la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original.
Blastocisto eclosionado	200-800	10-11	Los embriones salen de la zona pelúcida, pueden tener forma esférica y tiene un blastocele bien definido o colapsado.

La evaluación de embriones después del proceso de criconservación es una herramienta importante para estimar si la técnica utilizada fue la adecuada. Los aspectos importantes que se deben tener en cuenta son: forma del embrión, color, textura del macizo celular, número y compactación de las blastómeras, extrusión celular, si hay indicios de degeneración (vesiculación), presencia e integridad de la zona pelúcida (Palma 2001).

La supervivencia se puede evaluar a través del desarrollo de los embriones a estados más avanzados luego de un periodo de incubación (24, 48 y 72 horas) en cultivo in vitro, posterior a la criconservación y calentamiento (Gordon 1994).

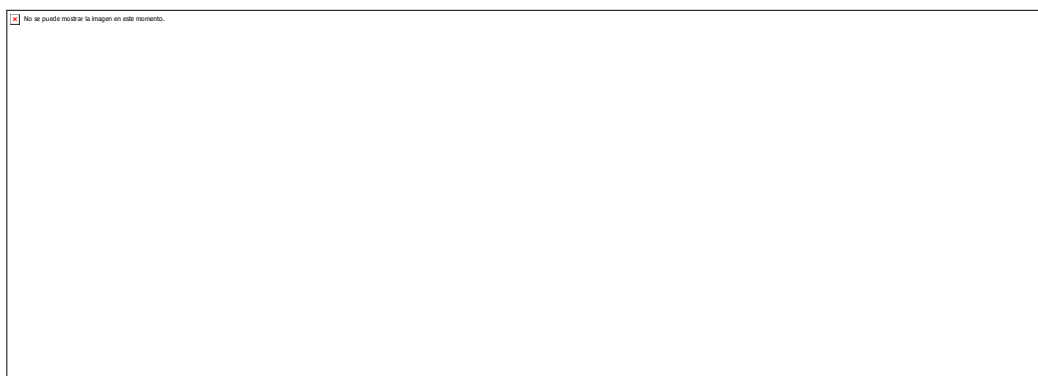
Otra técnica para la evaluación de embriones es la tinción fluorescente y/o supravital (Boggio 2002). Kaidi y col (2001) utilizaron un método de doble-tinción para determinar las alteraciones de la membrana celular. Los dos colorantes eran 1) Propidio Iodado (PI; Sigma), que es un marcador del ácido nucleico que excluye las células intactas; puede incorporarse solamente a las células con la integridad de la membrana alterada (se ve de color rojo a luz ultravioleta); y 2) Bisbenzimidida (BIS; Hoechst 33342; Calbiochem), la cuál incorpora todas las células y altamente específico y cuantitativo para el DNA (se ve de color azul a luz ultravioleta). En células con alteraciones de la membrana, la fluorescencia de la Bisbenzimidida es apagada por el Propidio Iodado, que absorbe la energía y emite fluorescencia roja. La doble tinción es particularmente conveniente para determinar lesiones de la membrana en células embrionaria.

Otro método para determinar viabilidad, es la evaluación de la morfología y calidad del embrión luego de la vitrificación y calentamiento. Esto indica que un embrión que reexpanda y tenga una buena calidad luego de ser cultivado in vitro, será considerado viable (Gordon 1994). La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), ha establecido una pauta internacional para la clasificación y la

evaluación de embriones por su calidad. En ésta se establece como calidad 1 los embriones excelentes, calidad 2 para embriones buenos, calidad 3 para embriones regulares y calidad 4 para embriones malos (Thibier 2000).

Palma (2001), describió la siguiente morfología para la evaluación de embriones:

TABLA 5



3.7.8. SELECCIÓN DE EMBRIONES CUYES Y CONEJOS

Históricamente se han utilizado dos enfoques para la criopreservación: (i) la congelación controlada y (ii) la vitrificación (congelación ultra-rápida). Existen básicamente dos tipos de congelación controlada, la congelación lenta y la congelación rápida. En el sistema de congelación lenta, la temperatura desciende aproximadamente de 0,3 a 2°C por minuto en un medio con concentraciones bajas de crioprotectores (por ejemplo, glicerol 1,5M) hasta -30 a -80°C.

De esta manera las células tienen tiempo suficiente para eliminar exceso de líquido (deshidratarse) y equilibrarse con el medio (por eso se llama también método de congelación equilibrada).

Por el contrario, en los métodos de congelación rápida (llamados “casi equilibrados”) la congelación ocurre más rápidamente (aproximadamente 200°C por minuto) que el tiempo requerido por las células para deshidratarse y equiparar la presión interna, por

lo que existen más riesgos de que se formen cristales de hielo en su interior. En ambos métodos, el paso final será guardar los contenedores (criotubos, ampollas o pajuelas) en los tanques de nitrógeno líquido.

Por último, el método de vitrificación implica la formación de vidrio en vez de cristales de hielo, en el interior de las células. Durante este proceso el agua llega al estado sólido (vítreo) sin pasar por la formación de cristales. Esto se logra por medio de una congelación ultra-rápida ($>1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y el uso de altas concentraciones de crioprotectores. Las células son deshidratadas, antes de la congelación, colocándolas en altas concentraciones de un crioprotector ($> 6\text{M}$). Este método presenta la ventaja de no tener que usar un sistema de congelación controlado (pudiéndose transferir las muestras directamente en nitrógeno líquido y sus vapores) y de no causar daños a la célula debido a que no se forman cristales de hielo. La única desventaja es la posible toxicidad del primer paso de deshidratación en el medio crioprotector.

Para que las células no se vean afectadas, se debe controlar en forma muy precisa la concentración del medio crioprotector, la temperatura y el tiempo.

3.8. PRÁCTICA # 3 C RIOCONSERVACION DE EMBRIONES

3.8.1. INTRODUCCION

Almacenamiento de embriones frescos.

Se han realizado pocos estudios con almacenamiento a corto plazo (1 a 2 días) a temperaturas de 0 a $+10^{\circ}\text{C}$. A través de esta técnica se pueden evitar enfermedades, ya que la zona pelúcida se conserva intacta y de esta manera protege contra ciertos virus. Durante el proceso de congelamiento-descongelamiento esta membrana se puede romper ocasionalmente.

3.8.2. OBJETIVOS

- Proteger de los efectos del enfriamiento y congelación
- Evitar la formación de hielo intracelular

- Proteger de los daños tóxicos de los crioprotectores tanto temperaturas bajas como altas

Criopreservación convencional

La criopreservación es la preservación de las células manteniéndolas a muy bajas temperaturas, lo que constituye una serie de procesos físico-químicos de transporte del agua y calor entre la célula y su medio. El aspecto más importante es remover la mayor parte del agua intracelular antes del congelamiento.

Existe una tasa óptima de enfriamiento para cada célula, y ésta depende de: tamaño de la célula, relación superficie-volumen, permeabilidad al agua y el coeficiente de temperatura para esa permeabilidad.

Se ha demostrado que el embrión de bovino de calidad excelente puede tolerar 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento, y todavía mantener desarrollo *in vitro* (Vitale *et al.*, 1994).

Entre las ventajas de criopreservar embriones, están: a) Pueden ser almacenados indefinidamente, b) Pueden ser colectados todo el año y transferidos durante la época reproductiva, c) Pueden ser almacenados y transferidos cuando la receptora esté disponible, d) Especies de animales en extinción pueden ser preservadas, e) La mitad de los embriones pueden ser congelados y la otra mitad transferida, y f) Facilita el transporte.

Entre las desventajas de criopreservar los embriones, están: a) Requiere de un técnico capacitado y la máquina congeladora es cara, b) Solamente embriones de alta calidad son apropiados para congelación y el resto de los otros embriones transferibles se descartan o transfieren sin congelar, y c) Cercadel 5% de los embriones congelados-descongelados son severamente dañados.

Las principales variables responsables del éxito en la conservación de embriones por congelación son:

1. Tipo y concentración de los compuestos crioprotectores
2. Formación de hielo
3. Ritmo de enfriamiento de -5 a -70 °C

4. Temperaturas de conservación
5. Ritmo de descongelación de -70 a -5 °C
6. Grado de dilución y temperatura

Tipo y concentración de los compuestos crioprotectores. Existen muchos alrededor del mundo, pero en general existen 2 categorías de crioprotectores:

Tipos Características Ejemplos

Intracelulares -Son de bajo peso molecular -Glicerol

- DMSO
- Son permeables al embrión
- Etilenglicol
- Propilenglicol Extracelulares
- Son de alto peso molecular
- Sucrosa(son azúcares y proteínas)
- Seroalbumina bovina
- Ácido hialurónico
- Polivinilpirrolidona(PVP)
- Son impermeables al embrión
- Hidrosietilo de almidón (HES)
- Dextranos
- 1,2 propanadiol (PROH)
- Glucoproteínas de peces del antártico (congelan a -2.5°C)

Su efecto protector de los crioprotectores intracelulares se debe a factores como:

- a) Reducción del daño por el efecto de la solución y congelamiento intracelular;
- b) Disminución de las temperaturas en las que ocurre el congelamiento intracelular; y
- c) Estabilización del efecto sobre las membranas. Se recomienda que un crioprotector intra celular tenga: alta solubilidad, baja toxicidad en altas concentraciones y bajo peso molecular.

3.8.3. INTRODUCCION:

Esta sección de criopreservación se tomó del manual de la Universidad Estatal de Colorado (Seidel, 1988 a, b) y del libro de laboratorio para producción de embriones (Gordon, 1994).

El primer reporte exitoso de congelación de embriones de mamíferos fue el de Whittingham en 1971, en ratones, y a partir de aquí se han desarrollado diferentes técnicas y métodos en animales de granja. En 1973, Willmut y Rowson obtuvieron los primeros nacimientos de embriones de bovino criopreservados pero con supervivencia menor a 5%. A partir de esto, el porcentaje de supervivencia de los embriones criopreservados ha sido mejorado, a través de los siguientes factores: calidad embrionaria, selección de la receptora, y sincronización de la receptora y donadora. Con esto se han llegado a obtener porcentajes de preñez de un 60% o hasta superiores.

3.8.4. **OBJETIVOS:** Conocer los tipos y concentraciones de los compuestos crioprotectores.

Materiales requeridos antes y durante el congelamiento

- Embriones para congelar
- Solución crioprotectora estéril
- Caja de Petri estéril
- Pipeta para captar los embriones
- Pajillas estériles
- Canastillas
- Cronómetro
- Aparato para congelamiento
- Pinzas para el “seeding”
- Nitrógeno líquido
- Materiales requeridos en el descongelamiento
- Pajillas con embriones congelados
- Citodescongelador

- Pinzas para tomar las pajillas
- Corta pajillas o tijeras
- Soluciones diluyentes estériles del crioprotector (solo si se hace dilución del glicerol)
- Caja de Petri estéril para remover crioprotector (solo si se hace dilución del glicerol)
- Pipeta para captar los embriones (solo si se hace dilución del glicerol)
- Microscopio estereoscópico (solo si se hace dilución del glicerol)
- Cronómetro (solo si se hace dilución del glicerol)

3.8.5. Criopreservación con glicerol

La siguiente técnica se ha trabajado con buenos resultados en la Universidad Estatal de Colorado (Seidel,1988a) para congelar embriones de 6 a 8 días de edad, los cuales son colectados por procedimientos estándar. Utilice solamente embriones de buena a excelente calidad. Si son embriones producidos *in vitro*, utilizar blastocistos de 7 días de edad. La criopreservación se debe realizar preferentemente de 3 a 5 horas de recuperados los embriones. Todos los pasos (5) se deben realizar a la temperatura del cuarto (37°C).

- 1) Se recomienda lavar los embriones con 3 a 4 cambios de una solución que contiene solución fosfatada buferada (PBS) + 0.4% de BSA (o 4 mg/kg) o 10% de suero inactivado con calor. Si los embriones se van a exportar se requiere de 10 lavados. Este procedimiento se realiza para diluir los contaminantes.
- 2) Coloque los embriones en una solución de PBS + 10% de suero + 10% de glicerol (o 1.4 molar) por 10 a 20 minutos (0.4% de BSA puede reemplazar al suero al 10% para todos los pasos). Durante los primeros 30 segundos el embrión pierde de 40 a 60 % de su volumen.
- 3) Coloque los embriones en pajillas francesas etiquetadas de 0.25 o 0.5 cc. Las pajillas se deben de llenar de la siguiente manera: llene un

tercio de la pajilla con una columna de medio de congelación, luego aspire una burbuja de aire de 3 a 4 mm, después aspire otra columna de medio de congelación conteniendo al embrión. Aquí la pajilla estará a un 70% de su capacidad. Luego aspire otra burbuja de aire de 3 a 4 mm, y finalmente aspire una columna final de medio. Así, que la pajilla estará un 90% de llena cuando la punta se sella (se puede usar calor o tapas). Colocar la pajilla dentro de la máquina congeladora con el lado sellado con calor hacia abajo.

- 4) Baje la temperatura de las pajillas hasta -6 a -7°C, disminuyendo la temperatura de 2 a 4 °C por minuto. Bajarla más rápido a -6 a -7°C probablemente no sea peligroso.
- 5) Sigue el “seeding”: toque las pajillas con una pinza hemostática helada en nitrógeno líquido, después de que las pajillas han estado a -6 a -7°C por 5 minutos, y déjelas de -6 a -7°C por 10 minutos adicionales. Baje la temperatura de las pajillas a -30 °C a un ritmo de 0.5 °C por minuto. Después de 2 a 3 minutos de que las pajillas hallan alcanzado los -30 °C, sumérgalas dentro de nitrógeno líquido en 2 a 3 segundos.

Para descongelar las pajillas, sosténgalas al aire por 12 segundos si son pajillas de 0.25 cc o por 20 segundos si son pajillas de 0.5 cc, y luego transfíralas a 37 °C por 15 a 20 segundos. Después del descongelamiento, realice los pasos que siguen a temperatura del cuarto (37 a 39 °C).

El siguiente paso es la dilución del crioprotector (glicerol), el cual puede ser removido en 3 formas:

- 1) El viejo método estándar consiste en diluirlo en 6 pasos: Comenzando con PBS + 10% suero + 8.3% de glicerol; pasos 2 al 6) disminuya el glicerol en esta mezcla para los 5 pasos en el siguiente orden 6.7, 5,

3.3, 1.7 y finalmente 0% de glicerol, permitiendo 6 a 7 minutos por paso.

- 2) Dilución en 4 pasos: utilice PBS + 10% de suero con 6% de glicerol + 10.3% (0.3 M) de sucrosa; el segundo, PBS + 10% de suero con 3% de glicerol + 10.3% de sucrosa; el tercero, PBS + 10% de suero con 10.3% de sucrosa; y finalmente el cuarto, PBS +10% de suero sin glicerol ni sucrosa. De nuevo, programe de 6 a 7 minutos para cada paso.
- 3) Dilución en 1 paso: El glicerol puede ser removido a en una solución de sucrosa 1.0 molar. Aunque, se cree que este tratamiento puede resultar en daños severos, especialmente con los embriones de pobre calidad.

3.8.6. Criopreservación con etilenglicol

Este procedimiento ha sido utilizado tanto para la congelación de embriones producidos *in vivo* como para los producidos *in vitro*.

- 1) Solo utilizar blastocistos del día 7 y con el grado de calidad más alto (calidad
- 2) Suspenda el blastocisto en etilenglicol al 1.8 molar en PBS suplementado con 10% de suero de novillo a 25°C y manténgalo por 10 minutos.
- 3) Cargue el blastocisto en la porción media de una pajilla de 0.25 o 0.5 ml en una pequeña porción de medio de congelación. Las pajillas se deben de llenar de la siguiente manera: llene un tercio de la pajilla con una columna de medio de congelación, luego aspire una burbuja de aire de 3 a 4 mm, después aspire otra columna de medio de congelación conteniendo al embrión, aquí la pajilla estará a un 70% de su capacidad, luego aspire otra burbuja de aire de 3 a 4 mm, y finalmente aspire una columna final de medio, de tal manera que la pajilla esté a un 90% de llena cuando la punta se sella (se puede usar calor o

tapas). Coloque la pajilla dentro de la máquina congeladora con el lado sellado con calor hacia abajo.

- 4) Enfríe las pajillas a -7°C , bajando la temperatura a 1°C por minuto.
- 5) A los -7°C realice el “seeding”, y mantenga la pajilla por 10 minutos a esa temperatura, luego baje la temperatura a -30°C con una velocidad de 0.3°C por minuto.
- 6) Sumerja la pajilla directamente al nitrógeno líquido para su almacenamiento. Para el descongelado, mantenga la pajilla al aire por 6 segundos y póngala a baño maría a 35°C . Coloque la pajilla en el instrumento de transferencia de embriones e inmediatamente transfiera el embrión a la receptora sincronizada (saludable, grande, vaquilla madura o vaca joven en buena condición). Tome los cuidados necesarios para mantener la esterilidad requerida durante la manipulación de la pajilla.

Antes de aplicar el embrión, ponga una inyección epidural de lidocaína y también un tranquilizante si quiere mayor comodidad durante el procedimiento. Identifique el ovario que contiene el cuerpo lúteo, pase el cérvix con la pistola de transferencia y deposite el embrión en la porción media del cuerno uterino del mismo lado del cuerpo lúteo. El descongelamiento y la transferencia de los embriones se deben realizar lo más pronto posible, de 2 a 5.

3.8.7. CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES BOVINOS

Medios para el Cultivo de Embriones

En esta sección se describen algunos medios definidos (KSOM, CR1aa, CR2) para el cultivo de embriones. La utilización de co-cultivos con células de la granulosa se explica en el Apéndice A.

KSOM

Es un medio utilizado para el cultivo in vitro de los embriones.

1. Compre KSOM de un proveedor (disponible en Cell and Molecular Technologies) y almacénelo congelado. Úselo con cautela después de la fecha de caducidad proveída por el fabricante. Una vez descongelado, mantenga a 4°C por 2 semanas.
2. Para preparar una solución stock KSOM de 5 ml, adicione:
 - Seroalbumina bovina (SAB), AGELF- 15 mg (3.00 mg/ml)
 - Gentamicina (Solución Stock 8A) - 2.5 µl (0.5 µl/ml)
 - Aminoácidos No esenciales (100X) - 50 µl
 - Aminoácidos esenciales (50X) - 100 µl
3. Filtre estérilmente el medio a través de una jeringa con filtro de 0.22 µm dentro de un vaso de precipitado estéril de 10 ml. Úselo inmediatamente.
CR1aa

Este es un medio de cultivo alternativo para cultivo de embriones de bovino. La patente de este medio de cultivo pertenece al laboratorio Infigen de los Estados Unidos de América .

1. Elabore la solución stock CR1 (prepare en un matraz volumétrico de 100):
 - NaCl 0.670 g
 - KCl 0.023 g
 - NaHCO₃ 0.220 g
 - Piruvato de Na 0.004 g
 - Glutamina 0.015 g
 - Lactato Hemi-Ca 0.055 g

Adicione los primeros 5 ingredientes a una matr az volum etrico. Añada agua (solo 90 ml). Disuelva totalmente los constituyentes y agregue el Lactato Hemi-Calcio. Luego adicione el agua restante. Almacene hasta por 2 días a 4°C.

Nota: Los constituyentes de este medio se pueden precipitar en la solución. Para minimizar las posibilidades de que esto ocurra, hay que cerciorarse de que todos los constituyentes están disueltos antes de añadir el Lactato Hemi-Calcio y utilizar

inmediatamente después de elaborado. Si un medio tiene una apariencia blanca o nublosa, hay que descartarlo y comenzar de nuevo.

2. Para preparar el CR1aa, hay que adicionar los siguientes ingredientes a los 5 ml de la *solución stock CRI*:
 - Seroalbumina bovina (SAB), AGELF- 15 mg (3.00 mg/ml)
 - Gentamicina (Solución Stock 8A) - 2.5 μ l (0.5 μ l/ml)
 - Aminoácidos No esenciales, 100X - 50 μ l
 - Aminoácidos esenciales 50X - 100 μ l Filtre estérilmente el medio a través de un filtro de jeringa de 0.22 μ m dentro de un vaso de precipitado estéril de 10 ml. Fresco úsese inmediatamente o refrigérese.

3.8.8. CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES OVINOS Y CAPRINOS

Conservación por enfriamiento a 5 °C

La posibilidad de conservación de embriones facilita la difusión de material de alto valor genético a nivel local o regional. Para un transporte a corta distancia, la refrigeración a 5 °C permite su conservación por 24 horas, en medio de cultivo (Ovum Culture Medium). La velocidad de enfriamiento se realiza a razón de 1 °C por minuto. El calentamiento de los embriones se realiza a 0.6 °C por minuto o bien se colocan directamente a 37 °C en PBS enriquecido. Se examinan a la lupa, se seleccionan y se siembran inmediatamente. El porcentaje de sobrevivencia varía entre el 35 al 48% (Bilton y Moore, 1976; Driancourt y col, 1988)

Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido

En animales domésticos, los primeros resultados se publican en la década del 70 (Whittingham y col, 1972; Wilmut y Rowson, 1973). En 1976 se publicaron los primeros trabajos en caprinos (Bilton y Moore, 1976) y en ovinos (Willadsen y col, 1976). Al igual que el semen de estas especies, es posible realizar el congelamiento de sus embriones y mantenerlos en nitrógeno líquido por períodos prolongados. Este método de conservación ha permitido la comercialización internacional y por ende la difusión

a nivel mundial del material genético. El procedimiento consiste en someter las células embrionarias a la incorporación de medios crioprotectores. Estos compuestos (polialcoholes) son capaces de penetrar en las células por difusión simple y su función es disminuir la formación de los cristales de agua por medio del descenso del punto de congelación. El medio que contiene los embriones (extracelular) es más rico en agua que el medio intracelular. Por lo tanto, al comienzo del congelamiento, la formación de los primeros cristales de hielo se produce en el medio extracelular, generando la salida de agua intracelular hacia el exterior, por difusión, y disminuyendo la formación de hielo intracelular. Los tiempos y la velocidad del proceso de congelamiento determinan la futura viabilidad del embrión.

Para ambas especies se ha determinado la mayor eficiencia de sobrevivencia embrionaria post descongelamiento cuando se emplea etilenglicol, respecto al glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) (ovinos, Tervit y Goold, 1984; caprinos, Le Gal y col, 1993). Como valores de referencia, es posible obtener porcentajes de preñez entre el 39 al 55% (Tervit y Goold, 1984; Hunton y col, 1985; Le Gal y col, 1993). La congelación se realiza con embriones de calidad excelente o muy buena, en estado de mórula compacta o blastocisto expandido (día 6to o 7mo post estro). El estadio de blastocisto es más resistente al congelamiento, debido a que una parte de las células puede sufrir severos daños, pero sin que se limite su futuro desarrollo. La selección de los embriones antes de su congelamiento es de vital importancia, debido a que su estado determina sus posibilidades de sobrevivir a la descongelación. Los blastocistos sin membrana pelúcida pueden ser congelados sin afectarse su sobrevivencia. Las limitantes en este caso son de tipo sanitario. La conservación de embriones en nitrógeno líquido puede llevarse a cabo mediante la técnica de congelamiento o vitrificación.

Técnica de congelamiento

Una vez recuperados los embriones, se seleccionan y colocan en baños sucesivos de 10 minutos en soluciones crecientes de etilenglicol (0.5 M, 1 M, 1.5 M) (Anexo 2) en PBS con 20% de suero fetal bovino a temperatura ambiente. Durante este período se produce encogimiento celular por pérdida de agua y lenta reexpansión por ingreso del

crioprotector. Finalizada esta etapa, se colocarán en pajuelas de 0.25 cc. Es importante rotular las pajuelas, indicando la hembra donante, raza, número de embriones y fecha. Los embriones se acondicionarán en la pajuela con la solución de 1.5 M etilenglicol en PBS, separados hacia ambos extremos por un espacio de aire y una columna de PBS + suero. A continuación, se sella la pajuela con alcohol polivinílico. Renard y col. (1982) presentaron la posibilidad de introducir dos cámaras de sucrosa 0.25M en PBS en ambos extremos de la pajuela, quedando los embriones en PBS + etilenglicol 1.5 M en una cámara central (separada de las anteriores por cámaras de aire). Una vez descongelada la pajuela, se agita para que se produzca la unión de las cámaras. Los embriones no se observan a la lupa, sino que todo el contenido de la pajuela se transfiere a la hembra receptora. Este método es rápido y se logra una aceptable sobrevivencia embrionaria (55 a 65%) (Tervit y Goold, 1984; Hunton y col, 1985; Heyman y col, 1987; Le Gal y col, 1993). Una vez acondicionados los embriones, las pajuelas se disponen en el congelador programable o bien se puede utilizar un congelamiento manual. Para éste es necesario disponer de un cilindro de acero, donde se ubican las pajuelas y el sensor de un termómetro, unido a un vástago agujereado (con barra en T) que permita graduar el descenso del conjunto en la boca del termo de nitrógeno. El tiempo entre colecta e inicio del congelamiento no debe superar los 40 minutos. El descenso de temperatura se realiza a razón de 1 a 3 °C por minuto hasta -7 °C. A los 30 segundos de permanencia en esta temperatura, se procede a realizar el seeding (inducción a la cristalización). El seeding se realiza con una pinza enfriada en nitrógeno líquido, mediante contacto de 2 a 3 segundos sobre cada uno de los bordes de la fracción de aire situada por encima de la columna que contiene los embriones. Su función es inducir la formación temprana de cristales de hielo, de tal manera que la tasa de enfriamiento es menor, las células disponen de más tiempo para deshidratarse y se minimiza el daño celular (de la Vega y Wilde, 1991). Posteriormente, la temperatura se mantiene a -7 °C durante 10 minutos (tiempo de equilibramiento), al término de los cuales, se continúa el descenso térmico a razón de 0.3 °C por minuto hasta -35 °C. El tiempo de estabilización a -35 °C es de 15 minutos. Luego, las pajuelas se transfieren al termo de nitrógeno líquido y se sumergen en este medio a -196 °C

3.8.9. Técnica de vitrificación

Otra técnica de conservación a bajas temperaturas es la vitrificación

- . El principio físico se basa en someter a los embriones a una alta concentración de crioprotector en muy bajos volúmenes de solución, de manera de evitar la formación de cristales de hielo. El procedimiento para la vitrificación se realiza a temperatura de laboratorio (25 °C), entre pasos sucesivos de inmersión de los embriones en soluciones crecientes de glicerol y etilenglicol, en base de PBS con 20% de suero fetal bovino (Traldi y col, 1999;

Martínez y col, 2006). Brevemente: 1) Glicerol 10% durante 5 minutos, 2) Glicerol 10% + Etilenglicol 20% durante 5 minutos y 3) Glicerol 25% + Etilenglicol 25% durante 30 segundos (Anexo 3). A continuación los embriones son aspirados en tips con 1 l de medio (2 embriones/tip) y sumergidos en crio tubos con nitrógeno líquido (Gibbons y col, 2008; 2009). La Desvitrificación se realiza “al aire” a 37 °C durante 6 segundos. Inmediatamente los embriones son colocados durante 5 minutos en una solución de glicerol 12.5% + etilenglicol 12.5% + sucrosa 0.5 M en base de PBS con 20% de suero fetal bovino. Posteriormente se colocan a temperatura ambiente en dos soluciones de 0.5 M y 0.25 M de sucrosa (5 minutos por solución). Por último, los embriones son lavados 2 veces en PBS + suero (2.5 minutos por solución) (Gibbons y col, 2008) (Anexo 3). Mediante esta metodología en ovinos in vitro hemos obtenidos una tasa de protusión embrionaria del 50% para las mórulas y 81.6% para los blastocistos (Gibbons y col, 2008); y en caprinos, del 61% para blastocistos (Gibbons y col, 2009). En la especie ovina hemos obtenido una tasa de sobrevivencia embrionaria del 42% (mórulas) y 47% (blastocistos) y una tasa de preñez del 50% para ambas edades embrionarias (2 embriones/receptora) (Gibbons y col, 2010). En caprinos, mediante la vitrificación de blastocistos, hemos obtenido una tasa de sobrevivencia embrionaria entre el 64 al 70% y un 24 porcentaje de preñez entre el 64 al 86% (2 embriones/receptora) (Traldi y col, 2009; Gibbons y col, 2010). Esta técnica no es recomendable para vitrificar mórulas caprinas debido a su baja eficiencia reproductiva.

3.8.10. CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES PORCINOS

La criopreservación es la técnica de conservación de material genético que se aplica manteniendo los embriones a menos de $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ □ punto donde el material embrionario queda parado. Deberá ser reversible y que se mantenga la integridad celular. La finalidad es la de separar en el tiempo la obtención de los embriones y su transferencia □ mantenimiento indefinido. Se dice que su viabilidad sólo se afecta por las radiaciones ambientales y, por lo tanto, se piensa que puede aguantar sin problemas durante siglos.

El cultivo in vitro o in vivo no para el material embrionario y, por lo tanto, no permite el mantenimiento indefinido.

La refrigeración entre 0 y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ permite mantener los embriones unas horas.

El primer nacimiento se hizo en el 1972 en ratón. A partir de ahí, se han hecho en otras especies. En el cerdo se hace en el 1989 porque es una especie difícil, ya que es sensible a baja temperatura.

No es una técnica todavía efectiva del todo. Funciona muy bien en rumiantes □ viabilidad de embrión criopreservado es muy parecido a la del embrión fresco (50-60%). Pero no es siempre como el cerdo.

Como más joven es el embrión, más difícil es que supere la criopreservación y, por lo tanto, más frecuentemente blastocisto. La excepción se da en ratón y conejo, ya que todos los estadios son resistentes a criopreservación.

3.8.11. ETAPAS DEL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

Hay 6 etapas:

Embriones deben perder agua progresivamente. Además, también deben contactar con sustancias crioprotectoras. Protegen estabilizando la membrana (Dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol). Además, también bajan el punto de congelación del embrión.

Enfriar el embrión asegurándose que el medio extracelular congela de forma segura □ inducción de cristalización extracelular añadiendo cristales de hielo a $-5/-7^{\circ}\text{C}$.

Enfriar el embrión de forma lenta y progresiva a $-0.2^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$ a $-0.5^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$ con aparatos caros hasta -40°C . Puede durar hasta 3 horas. Tienen una capacidad limitada. En bovino, sólo un embrión / pajita.

Se almacena a -196°C en N_2 líquido de forma indefinida. La temperatura de la fase líquida es económica para tener bajas temperaturas porque es una forma fácil de tenerla.

Se debe descongelar cuando se quiere usar. La tasa de descongelación depende mucho de la temperatura a la que se paró el enfriamiento. Si se paró a -80°C , la descongelación debe ser lenta para que pueda recuperar su volumen de forma lenta y progresiva. Si se paró a -40°C , se sabe que hay muy pocos cristales pequeños intracelulares que no matan el embrión y se debe aplicar una descongelación rápida para que crezca por nucleación y evitar que puedan crecer los cristales dentro del embrión.

Se debe eliminar el crioprotector dentro del embrión. Hoy día se están descubriendo procedimientos que rompen con el enfriamiento lento y progresivo. El método convencional es de equilibrio. Los métodos de no equilibrio o vitrificación exponen los embriones a unas concentraciones de solutos tan altas que cuando se disminuye la temperatura, la viscosidad es tan grande que no cuenta, sino que vitrifica hasta que queda sólido sin cristalizar □ las moléculas quedan paradas sin cristalizar.

Los cristales tienen las moléculas organizadas y no son transparentes. Se consigue una solidificación sin formar cristales. Permiten una alta viabilidad, incluso para embriones muy sensibles a la manipulación.

Permite pasar de temperatura ambiente a N_2 líquido. Es un proceso muy rápido. La viabilidad más o menos es igual que la convencional.

La solución puede llegar a ser tóxica.

3.8.12. CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CANINOS

La criopreservación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos (Cabodevila y Teruel 2001). El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras, incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie, transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia, controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales vivos por la de embriones congelados libre de ellas, crear bancos de embriones de alto valor genético, entre otros (Celestinos 2003).

Desde el punto de vista práctico, la principal ventaja de la congelación de embriones, es que permite economizar y aumentar el rendimiento del uso de receptoras, aspecto que significa la mayor inversión en la industria de la transferencia de embriones (Boggio 2002).

Otra ventaja es que al trabajar con embriones congelados, la transferencia es independiente del tiempo, no se necesitan sincronizar receptoras y además permite controlar la época de partos (Boggio 2002).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196°C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc., es decir, reducir drásticamente la actividad fisiológica de la célula. Así es posible almacenar embriones durante un largo periodo sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos (Celestinos 2003). Leibo (1989) identifica cuatro etapas comunes a las

diferentes técnicas: exposición de los embriones a concentraciones molares de agentes crioprotectores, enfriamiento desde temperaturas fisiológicas hasta temperaturas lo suficientemente bajas como para causar un virtual cese de todas las reacciones químicas inducidas térmicamente, calentamiento desde la temperatura de conservación a temperaturas fisiológicas y finalmente, extracción del crioprotector (Cabodevila y Teruel 2001).

Desde 1972, considerables avances se han logrado en el estudio de muchos mecanismos involucrados en la supervivencia del embrión al congelamiento y descongelación, estos estudios han incluido curvas de enfriamiento, temperaturas de seeding e inmersión en nitrógeno líquido (N₂L), tasas y temperaturas de descongelación, tipo, concentración y métodos de exposición a crioprotectores, efectos tóxicos, protectores, producción de anomalías cromosómicas, inducción de fusión de membrana celular, efectos de agregado de diferentes sustancias al medio y electrolitos en la solución de congelación (Boggio 2002).

Entre otros factores se ha estudiado el potencial tóxico de los materiales utilizados (Schiewe y col 1986), métodos de observación y/o evaluación especiales (Massip y Mulnard 1980), maneras de mejorar la retención embrionaria, influencia del genotipo animal y estudios sobre volumetría, conductividad del agua y permeabilidad de los embriones a diferentes sustancias, entre otros (Songsasen y col 1995).

Las técnicas de crioconservación permiten conservar embriones por distintos periodos dependiendo de las temperaturas que se utilicen (Cabodevila y Teruel 2001).

Refrigeración: La refrigeración es un método simple por medio del cual pueden mantenerse embriones a temperaturas entre 0 y 4 °C durante 24 a 72 horas. La refrigeración de embriones se encuentra como un paso intermedio entre la transferencia de embriones en fresco (recién recolectados) y conservados a -196 °C. Es una técnica que permite detener el desarrollo embrionario y mantener la

viabilidad embrionaria mediante un simple refrigerador con hielo y agua para regular el descenso de la temperatura (Cabodevila y Teruel 2001).

La técnica se utiliza para transportar embriones cuando las receptoras se encuentran distantes de las donantes y también para conservar embriones hasta que receptoras asincrónicas alcancen la sincronización adecuada. No obstante, a pesar de los buenos resultados y de su sencillez, en la actualidad ha caído prácticamente en desuso debido a que la congelación convencional se ha convertido en una técnica que si bien es mas costosa, permite mantener la viabilidad embrionaria por tiempos ilimitados, con las ventajas prácticas que ello trae aparejado (Cabodevila y Teruel 2001).

La refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBS (Solución Buffer Fosfato) envasados en pajuelas de 0,25 ml y colocadas en un refrigerador (Celestinos 2003).

Congelación estándar: En el método de congelación estándar los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura y lo mantienen durante el enfriamiento (Cabodevila y Teruel 2001). La exposición de los embriones al medio de congelación (PBS mas glicerol) debe realizarse a temperatura ambiente (20-22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración. Este periodo incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas. Esto permite realizar más 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 enfriada con nitrógeno líquido; el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido, alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor. Una vez efectuado el seeding, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (periodo de estabilización) y luego se desciende a una velocidad entre 0,1 y 0,5 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. La descongelación se realiza de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en baño María a 30 ó 35 °C durante 20-30 segundos (Celestinos 2003).

Congelación rápida: Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, luego se les deshidrata nuevamente colocándose en una solución mixta de glicerol y sucrosa. Esta segunda deshidratación, deja a los embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el cuello del termo de nitrógeno durante 5 minutos, posteriormente son sumergidas en el nitrógeno líquido (Celestinos 2003).

Vitrificación: La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones (Celestinos 2003). Se efectúa una deshidratación parcial de los embriones sin que éstos alcancen su equilibrio osmótico. Es un proceso termodinámico mediante el cual el fluido incrementa su viscosidad durante el enfriamiento, adquiriendo las propiedades de un sólido. A diferencia de lo que ocurre durante la congelación, en la vitrificación no se forman cristales, sino que el fluido pasa a un estado sólido no estructurado similar al vidrio de donde la técnica toma su denominación (Cabodevilay Teruel 2001).

La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido no requiere más de 10 minutos (Celestinos 2003).

3.8.13. CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES CUYES Y CONEJOS

Como hemos mencionado, para preservar embriones en forma congelada se puede utilizar la congelación controlada y la vitrificación. Todos los estadios de pre-implantación del embrión del cuy y la rata son aptos para una criopreservación utilizando una gran variedad de crioprotectores, condiciones de congelado/descongelado y contenedores. Sin embargo, el estadio de ocho células (día

3) es el momento de elección para muchos laboratorios, debido a su mayor resistencia a la manipulación. A modo de ejemplo, la eficiencia general del sistema, medida como porcentaje de crías vivas sobre el total de embriones descongelados, oscila entre 15% para la línea BALB/c y 50% para DBA/2.

Como ejemplos:

1. Método que utiliza pajuelas de plástico como contenedores, propilenglicol (1,5 M) como crioprotector y congelación lenta hasta -30°C (utilizado por el *Frozen Embryo & Sperm Archive* (FESA), MRC *Mammalian Genetics Unit*, Harwell, Inglaterra y el *Institut Pasteur*, París, Francia).
2. Método con pajuelas de plástico, glicerol (1,5 M) como crioprotector y congelación lenta hasta -40°C (utilizado por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos).
3. Método de vitrificación en nitrógeno líquido en un medio concentrado de glicerol y suero de albúmina bovina (utilizado por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos).

4. CONCLUSIONES

Se concluye que al realizar este manual servirá como herramienta importante de trabajo en el laboratorio para el estudiante.

En este manual se ha recolectado información relevante acerca de los equipos y las técnicas al utilizarse en el laboratorio.

Para comprender aún más se realizó una práctica de criconservación de embriones en el laboratorio de la Universidad técnica de Cotopaxi para satisfacer la información del manual.

Este manual va hacer de gran ayuda en el laboratorio tanto para los estudiantes como para la persona que realizó.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda tomar en cuenta las normas que se presentan para ingresar al laboratorio y los cuidados necesarios de manipulación de los equipos para que la vida útil de los mismo sea la adecuada.

Revisar información adicional acerca de las técnicas ya que con el tiempo se pueden ir cambiando los protocolos para la crioconservación de embriones.

Realizar más herramientas para la utilización de los equipos y técnicas a realizarse en el laboratorio

Es indispensable realizar cuadros para registrar el ingreso del estudiante y el tiempo de uso de los equipos ´para tener un registro que a futuro sea de gran ayuda para el laboratorio.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1. Libros:

1. THE GENETICS OF THE DOG; Editado por: Elaine A. Ostrander and Anatoly Ruvinsky. 2da edición. ISBN: 978-1-84593-940-3 Editorial: Gwenan Spearing, Production editor: Fiona Chippendale. Printed and bound in the UK by CPI group (UK) Ltd, Croydon, CR0 4YY
2. Control de la reproducción en el conejo por Mario R. Alvariño. Impreso en España. ISBN: 84.341-0792-9 MAPA- IRYDA. ISBN: 84-7114-448-4 (Ed, Mundi- Prensa)- 1993.

6.2. Enlaces

1. Este trabajo fue presentado en el Simposio Internacional de la biología reproductiva en Beijing octubre de 2008.
2. © El autor, 2009. Publicado por la Oxford UniversityPress, en nombre de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología. Todos los derechos reservados. Para los permisos, por favor correo electrónico: journals.permissions@oxfordjournals.org
3. 2005 El autor publicado por la Oxford UniversityPress, en nombre de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología. Todos los derechos reservados. Para los permisos, por favor correo electrónico: journals.permissions@oupjournals.org

4. Folleto – Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. INTA Balcarce.

6.3. Sitios Web:

1. <http://www.economia.unam.mx/deschimex/cechimex/chmxExtras/documentos/propuestasbecas/2010/SaulSoto/SaulSotoAnexos.pdf> (07/10/2013; 11:20 am)
2. http://www.astromedtec.at/fileadmin/inhalte/documents/cryoLogic_freeze_control_brochure.pdf (07/10/2013; 13:34 pm)
3. <http://www.uacj.mx/ICB/cqb/licenciaturaenbiolog%C3%ADa/Documents/Manuales/optativas/BIOLOGIA%20DE%20LA%20REPRODUCCION.pdf> (11/10/2013; 14:35 pm)
4. http://www.cofupro.org.mx/cofupro/images/contenidoweb/indice/publicaciones-fpchiuhua/pdf/manual_embryones_ovinos.pdf (17/10/2013; 15:20 pm)
5. <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/5817/1/T14.09%20H433c.pdf> (23/10/2013; 12:50 pm)
6. <http://www.dorwil.com.ar/msds/Etilenglicol.pdf> (07/10/2013; 11:55 am)
7. <http://morfoudec.blogspot.com/2008/07/microscopa-de-contraste-de-fase.html> (28/10/2013; 13:00 pm)

8. <http://www.auxilab.com/documentos/manuales/equipos/estereomicroscopios/50234xxx.pdf> (28/10/2013; 19:00 pm)
9. <http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/3048/1/SellesSoriano.pdf> (05/11/2013; 10:10 am)
10. http://www.transtechsociety.org/docs/books/Benavides_Guenet_2003/02-GENETICA.pdf (07/11/2013; 11:02am)
11. http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd1-282/cgibin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_3986_Martinez
12. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/177/1/GuadalupePliegoPalacios.pdf>
13. <http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/187/1/Gilcorbalan.pdf>
14. http://web.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_1.4.10.pdf
15. <http://www.lamolina.edu.pe/gaceta/edicion2012/notas/nota017.htm>
16. [http://www.anditecnica.com/biotecnologia-reproductiva-
/bovino/transferencia-de-embriones-.html](http://www.anditecnica.com/biotecnologia-reproductiva-
/bovino/transferencia-de-embriones-.html)
17. <http://www.agro.uba.ar/users/catala/C11%20Biotecnologia%20de%20la%20reproduccion%20animal.pdf>
18. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fvp377o/doc/fvp377o.pdf>

19. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fvp377o/doc/fvp377o.pdf>
20. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=1609-911720110003&lng=es&nrm=iso
21. <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210335.pdf>
22. <http://es.scribd.com/doc/52945376/Tranferencia-de-embriones-en-Ovinos-y-Caprinos>
23. http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/14_17_29_tema_43_1.pdf
24. <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27058/2/articulo6.pdf>

7. ANEXOS

PLAN DE RENOVACION DE LOS EQUIPOS.

Laboratorio	Propuesta	Requerimiento	Vida Útil	Renovación
<p>Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi (Medicina Veterinaria)</p>	<p><u>INFRAESTRUCTURA</u></p> <p>Adecuar el laboratorio de biotecnología, el mismo que constará del área de equipamiento, la zona sucia, baño y el laboratorio donde se realizar las practicas</p> <p><u>EQUIPAMIENTO</u></p> <p>Dotar al laboratorio con los equipos necesarios para la realización de procedimientos académicos y de investigación</p>	<p><u>EQUIPOS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Criology 5500 • Esteriomicroscopio • Congelador • Microscopio de contraste de fases 	<p>4 – 6 Años</p> <p>6 – 7 Años</p> <p>4 – 6 Años</p> <p>7 – 8 Años</p>	<p>El Mantenimiento de estos equipos deberá ser realizado a los 3 años para verificar el correcto funcionamiento de los mismos, caso contrario si presentan alguna anomalía o mal funcionamiento se solicitara al técnico especialista la revisión de los equipos.</p>

