

Nº 189
2 E J.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
EN TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

TESIS PRESENTADA ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE MEDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR

RAYMUNDO NORIEGA SORIANO

1992

ASESORES: MVZ. ARTURO SANCHEZ ALDANA PEREZ
MVZ. JAVIER VALENCIA MENDEZ
MVZ. RICARDO FLORES CASTRO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	4
INSTALACIONES, EQUIPO Y MATERIAL.....	6
TECNICA DE LAVADO Y ESTERILIZADO DEL MATERIAL DE LABORATORIO.....	11
TECNICA DE PREPARACION DE MEDIOS.....	23
TECNICA DE COLECCION EMBRIONARIA.....	33
DESARROLLO Y MORFOLOGIA EMBRIONARIA.....	38
TECNICA DE BUSQUEDA, MANIPULACION Y EVALUACION EMBRIONARIA.....	41
TECNICA DE CONGELACION EMBRIONARIA.....	55
TECNICA DE DESCONGELACION EMBRIONARIA.....	65
CITA BIBLIOGRAFICA.....	73

RESUMEN

NORIEGA SORIANO RAYMUNDO. "Manual de procedimientos de laboratorio en transferencia de embriones" (bajo la dirección de: MVZ. Arturo Sanches Aldana., MVZ. Javier Valencia Mendez y MVZ. Ricardo Flores Castro.).

La transferencia embrionaria es una herramienta para el Mejoramiento Genético y reproducción del ganado bovino, requiere de una gran cantidad de pasos que por su importancia no deben de ser pasados por alto. Este manual de Transferencia Embrionaria es una guía para realizar las siguientes técnicas que se describen a continuación, se inicia con la descripción de las instalaciones, equipo y material en el área de laboratorio.

En la técnica de lavado y esterilización de material, si se efectúa en una forma adecuada y correcta, se podrá reciclar sin afectar al embrión y así disminuir los costos de producción.

En la técnica de colección embrionaria, se explica la metodología de como extraer el mayor número de embriones de la donadora, una vez que se halla palpado la respuesta de superovulación.

La técnica de búsqueda y evaluación es una metodología en donde se describe el lavado de los filtros recolectores, la búsqueda de embriones en la caja Petri y la evaluación morfológica de los embriones.

En las técnicas de congelación y descongelación se describe la

metodología adecuada para conservar la viabilidad embrionaria al cambiarlos de su medio ambiente natural.

INTRODUCCION

La transferencia de embriones es una técnica que contribuye a solucionar uno de los problemas más importantes de la ganadería Nacional (1.3.), que es incrementar a corto plazo un hato bovino con alta calidad genética. Para desarrollar esta técnica se emplean donadoras con alta calidad genética en la producción de leche o de carne.

Estos animales son sometidos a tratamientos hormonales de superovulación y después son inseminados artificialmente con semen congelado de toros, también con excelente calidad genética y 7 días después se recolectan los embriones producidos mediante un lavado uterino transervical ; estos embriones se evalúan y procesan con técnicas de laboratorio para ser transferidos finalmente a un grupo de hembras receptoras. Este proceso puede ser repetido 3 veces al año con las donadoras, obteniendo así un mayor número de crías de estos animales; siendo entonces esta técnica un instrumento que coadyuvará a detener la caída en la producción nacional de leche y carne, así como a disminuir las importaciones.

La elaboración del siguiente manual de laboratorio en la transferencia embrionaria tiene el objeto de presentar un trabajo en español que reúna y describa las técnicas necesarias para la colección, manipulación, evaluación, congelación y descongelación de embriones, apoyado en los procedimientos que se aplican en el Centro de Mejoramiento

Genético y Transferencia de Embriones (CEMEGEN), y en literatura publicada sobre el tema.

INSTALACIONES - EQUIPO - MATERIAL

Para desarrollar la técnica de laboratorio en la transferencia embrionaria, se debe contar con las instalaciones, equipo y materiales necesarios .

INSTALACIONES

Las instalaciones indispensables que se pueden utilizar en el campo o bien para montar un laboratorio equipado, debe de contar con los siguientes requisitos:

1.- La temperatura ideal para trabajar los embriones en el laboratorio debe de ser templada 22 a 25 °C, evitando los cambios bruscos de temperatura, por lo tanto las instalaciones deben de estar bien orientadas o bien contar con un clima artificial.

2.- Las mesas de trabajo para: búsqueda, evaluación, congelación, descongelación y preparación de medios se colocan alejadas de las ventanas donde llegue la luz directa del sol porque es perjudicial para los embriones.

3.- Una de las instalaciones primordiales dentro de un Laboratorio es la utilización de una trampa que da el acceso al medio externo y con ello evitamos las corrientes de aire directas que causan contaminación. Las instalaciones requeridas en el campo para evitar las corrientes de aire solo se pueden controlar con una habitación bien cerrada y con una buena ventilación.

Las instalaciones se desinfectan con sustancias que no sean tóxicas para los embriones, por ejemplo la desinfección de las mesas de trabajo, se efectúa utilizando alcohol al 70%.

Los medios para los embriones se deben elaborar en un sitio adecuado, cuyas características se detallan en la técnica de elaboración de medios.

MATERIAL Y EQUIPO

Se describirá por áreas el material y equipo que se recomienda utilizar para un laboratorio bien equipado y también el que se utiliza en el campo (23,27).

Area de elaboración de medios

- 1.- Flujo laminar.
- 2.- Báscula analítica o granataria de precisión.
- 3.- Baño María.
- 4.- Filtros Millipore de 0.22 o 0.45 micras.
- 5.- Frascos de 500 y 1000 ml. estériles.
- 6.- Probetas de vidrio Pyrex de 500 y 1000 ml esteriles.
- 7.- Matraces de vidrio Pyrex de 500 y 1000 ml estériles.

Sustancias

- 1.- Agua bidestilada o tridestilada estéril.
- 2.- Suero Fetal Bovino o Albumina Serica Bovina.
- 3.- Sobres de solución Buferada Fosfatada (PBS).
- 4.- Sacarosa.

5.- Glicerol.

6.- Sulfato de Estreptomicina.

7.- Penicilina G-Sódica.

Area de Coleccion embrionaria.

1.- Donadora gestante de 6.5 a 7.5 dias.

2.- Agua para lavar el tren posterior de la donadora.

3.- Jaula con sombra.

4.- Manguera Tygón.

5.- Filtro Emm-Com.

6.- Sonda Foley Adex con calibre FR 16, 18, 20, 22.

7.- Medio Dulbecco Fosfatado Modificado (PBS) de GYBCO, adicionado con .4% de Albumina Serica bovina ó 1% de suero fetal inactivado.

8.- Prostaglandinas o analogos, Lutalyse, ovalise, etc.

9.- Estilete para sondas Foley.

10.- Dilatador metálico servical.

11.- Lidocaina al 3% (Anestesia epidural).

12.- Adaptadores para jeringas de 20 ml para poder inflar los globos de las sondas Foley.

Area de Búsqueda y Evaluación

- 1.- Medios de PBS sin Albumina o suero fetal bovino para lavar los filtros Emm-Com.
- 2.- Jeringas de 20 ml automaticas o desechables con aguja de 22 x 32 para el lavado de los filtros Emm-Com.
- 3.- Cajas petri de plástico cuadriculadas, desechables y esteriles de 100 x 15 que son utilizadas para la búsqueda de embriones.
- 4.- Cajas petri de plástico desechables de 35 x 10 que son utilizada para la recolección embrionaria.
- 5.- Cajas petri de plástico desechables esteriles de 100 x 15 no ralladas para lavar a los embriones.
- 6.- Microscopio Estereoscópico con capacidad de 12 x para realizar la búsqueda embrionaria y 50 x para realizar la evaluación de los embriones.

Area de congelación embrionaria

- 1.- Embriones viables evaluados.
- 2.- Microscopio Estereoscópico.
- 3.- Microscopio Invertido con una capacidad de 300x que se utiliza para la reevaluación morfológica de embriones, con una dudosa evaluación obtenida en el microscopio estereoscópico a 50x. Se pueden utilizar microscopios con una menor potencia, dependiendo de la experiencia y habilidad del técnico evaluador.
- 4.- Congeladora manual de embriones o congeladora automática.

- 5.- Medio para congelar embriones PBS más un 10% de glicerol.
- 6.- Pajillas francesas de 0.25 ml. estériles.
- 7.- Termo con nitrógeno líquido con capacidad de 18 a 32 Kg.
- 8.- Sellador eléctrico para pajillas.
- 9.- Bastones y Gobelet's.
- 10.- Nitrógeno líquido.

Area de descongelación embrionaria

- 1.- Embriones congelados.
- 2.- Microscopio Estereoscópico.
- 3.- Aplicador de embriones.
- 4.- Medios para descongelar embriones.
- 5.- Fundas para transferencia o para inseminación.
- 6.- Camisas sanitarias.
- 7.- Caja Multi-Weldish de 4 pozos con capacidad de 2.5 ml.C/U.
- 8.- Estiletes para pajillas.
- 9.- Pajillas francesa estériles de 0.25 ml.
- 10.- Receptora que tenga 7 días post-calor.

Nota: Todo el material que está directamente en contacto con los embriones, debe estar completamente estéril.

Material utilizado en general.

- 1.- Tijeras de cirujano.
- 2.- Pinzas Kelly.
- 3.- Pinzas de disección.
- 4.- Jeringas de 5 y 20 ml.

- 5.- Jeringas insulínicas.
- 6.- Agujas hipodérmicas de 20 x 32.
- 7.- Termómetro de laboratorio de -40° C a 150° C.
- 8.- Cronómetro.
- 9.- Bulbos de latex para las pipetas Pasteur.
- 10.- Pipetas Pasteur con punta redondeada con una abertura de 250 a 300 micras.
- 11.- Clamp.
- 12.- Termo cafetero de 1 litro.
- 13.- Picetas con alcohol al 70%, agua bidestilada y cloruro de benzalconio.
- 14.- Gasa.
- 15.- Parafim.
- 16.- Papel absorbente.
- 17.- Maskin-Tape.
- 18.- Marcador indeleble punto fino.

Técnica de Lavado y Esterilizado del Material de Laboratorio

Si se efectúa en una forma responsable y eficiente el lavado y la esterilización del material, al eliminar sustancias tóxicas o agentes biológicos que dañan a los embriones, se obtendrán buenos resultados al reciclar el material, considerando también una disminución en los costos de producción, pues la mayoría del material es de importación (7,21,23,30,31).

Para obtener resultados satisfactorios en esta área se divide en tres pasos importantes:

- 1.- Lavado de material
- 2.- Empaquetado del material
- 3.- Esterilización

1.- Lavado de material

El material sucio sigue un procedimiento para poder ser lavado y ser reciclado adecuadamente.

1.1.- Enjuague del material sucio.

Para eliminar de la superficie los residuos tanto de materia orgánica como inorgánica, se utiliza agua corriente a presión y se ejerce un cepillado energético para que al momento de utilizar el detergente de elección como es el " Extran " en el material de cristalería, metálico y de plástico no se vea disminuido su efecto bactericida.

Nota: La malla de los filtros Emm-Com no se talla, sólo se enjuaga energicamente.

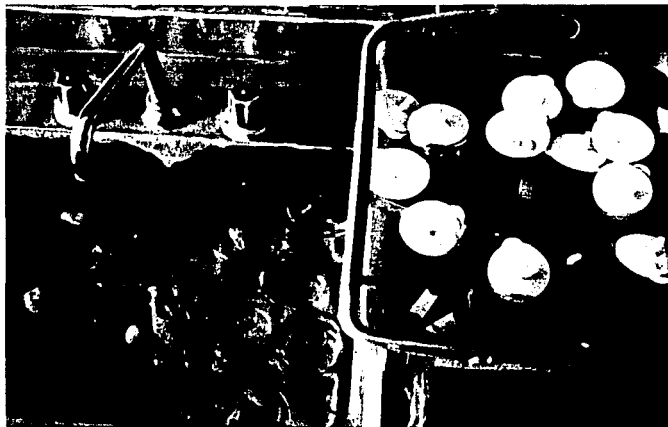
1.2.- Inmersión del material de laboratorio.

Previamente enjuagado el material de:

Cristalería: Provetas, vasos precipitados, matraces, frascos utilizados para los medios.

Metálico: Aplicadores de transferencia e insemínación, tijeras, pinzas de Kelly.

Plástico: Filtros Millipore, filtros Em-con, sondas Tygón, sondas Foley, jeringas, tapon de hule.



Fot. 1. Se observa el macetero utilizado en la transferencia de embriones, sumergido en detergente "Eucrasan".



Fot. 2. La ebullición es utilizada para la limpieza de las pipetas Pasteur.

Se sumergen en agua corriente o en agua desionizada que contenga un detergente, el más recomendado para el material de laboratorio es el Extrán alcalino o ácido. (Fot. 1), por la baja toxicidad de sus residuos y por la fácil eliminación de ellos con agua corriente a presión. se hace un cepillado energico al mismo tiempo. La concentración de extrán varia de acuerdo a la suciedad y al volumen del material que va del 1% a un 20%, el material debe de permanecer durante dos horas como minimo y de 24 a 36 horas como maximo en extrán, para que ejerza su acción primordial, que es la destruccion de los agentes patogenos.

Para aumentar la acción del detergente se emplea la ebullición que se alcanza a una temperatura de 90-100°C (Fot.2).

1.3.- Enjuague del material.

Se realiza con agua corriente a presión, al mismo tiempo que se talla energicamente para eliminar en su totalidad los residuos del detergente. Para el enjuague de las sondas Foley y Tygon se conectan directamente a la llave del agua durante 30 a 60 minutos, para eliminar los residuos del detergente. En el caso de los filtros Emm-Com estos se enjuagan con agua a presión agitándolos energicamente, recordando que la malla del filtro es sumamente delicada y no se puede tallar porque se rompe. El enjuague se realiza de 8 a 10 veces para todo el material.

1.4.- El segundo enjuague se efectúa con agua desionizada

(bidestilada o tridestilada) para eliminar los minerales del agua corriente.

El material una vez enjuagado se pone a escurrir boca abajo, evitando con ello la penetración de polvo.

1.5.- Secado del material.

Se utiliza una estufa bacteriológica, el horno Pauster o un secador para material que mantenga una temperatura de 35°C a 40°C durante una o dos horas, procurando que no permanezca más tiempo, ya que se provoca la desnaturalización del material (Fot. 3).

2.- Empaquetado del material.

El material una vez seco se empaqueta y varía de acuerdo al método de esterilización a utilizar.

a) Bolsa universal de papel Kraff.

b) Bolsa de plástico.

a) Cuando se esteriliza por calor húmedo, se utiliza una bolsa universal de papel Kraff para empaquetar: cubrebocas, sondas Foley, jeringas desechables, tapones de hule, material metálico, filtros millipore, con su membrana o tamiz de 0.22 ó 0.45 micras, que al momento de cerrar el filtro se deja una media vuelta abierto para que circule el vapor de agua y no se quemem las membranas. El material de cristalería con tapón de rosca, se deja también media vuelta abierto para que circule el aire caliente dentro del material y al momento de sacarlos del autoclave se cierran inmediatamente. El material que se

esteriliza bajo este sistema debe presentar una cinta testigo que indique la variación de color de blanco a negro, indicando con ello su esterilización.

El material empaquetado finalmente se introduce a un secador para eliminar por completo la humedad restante (Fot. 3).

b) Cuando se envía el material a esterilizar por rayos gama se emplean tiras o bolsas de plástico adecuadas al tamaño del material, sellando las bolsas previamente con un sellador eléctrico y depositando el material en cajas de cartón con 30 cm de ancho por 40 cm de largo y con 90 cm de profundidad, que son las medidas requeridas para los bastidores utilizados en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (I.N.I.N).

3.- Esterilización

Es la destrucción de todo tipo de vida existentes en los materiales o sustancias, la cual se realiza por métodos físicos o químicos.

Esta área del laboratorio es importante, pues se debe tener cuidado en la esterilización del material ya que de no realizarse debidamente puede ser perjudicial para los embriones (26, 27).



Fot. 3. Material utilizado en la técnica de transferencia embrionaria, secándose en una estufa bacteriológica.



Fot. 4. Autoclave utilizado para esterilizar por medio de calor húmedo.

A continuación se describe una tabla de los métodos más utilizados para la esterilización de material de Laboratorio.

Método Físico

3.1.- Calor

a) Calor Húmedo

Vapor a presión, autoclave: (121°C, 15 lb., 15 min.).

(121°C, 15 lb., 30 min.).

b) Calor Seco

Aire caliente (Horno Pasteur de 250°C a 300°C, durante 1 a 2 horas).

3.2.- Filtración

a) Filtros de membrana, con poros de 0.8, 0.6, 0.22, 0.45 μ m de diámetro.

3.3.- Radiación

a) Radiación Ionizante: (Rayos gama σ , de 1.75 a 2 megarats/1 hr.).

3.1.- Calor

Este tipo de esterilización provoca una desnaturalización de las proteínas, coagulándolas.

El factor que más influye cuando se esteriliza por este método es la presencia o ausencia de humedad, ya que ésta es la que determina la temperatura exacta a la que mueren los microorganismos.

En términos generales, la esterilización por calor húmedo es más eficaz.

a) Calor Húmedo

Vapor a Presión.- Este sistema es de utilidad para destruir tanto formas vegetativas como esporuladas. Se realiza en un recipiente herméticamente cerrado (autoclave), en la que se produce una presión por el vapor de agua, lo cual permite lograr temperaturas mayores a las que se obtienen en la ebullición. Durante este procedimiento es importante la completa evacuación del aire del recipiente, ya que la temperatura de la mezcla de aire-vapor es más baja que la del aire puro. Al proceso de eliminación del aire frío se le denomina purga del autoclave y se realiza a través de una válvula de escape que puede variar de acuerdo con las especificaciones del modelo de autoclave que se utilice. Las autoclaves deben tener un manómetro que indique la presión interna. La presión que debe alcanzar es de 15 libras (1.1 Kg./cm²) y a esta presión la temperatura alcanzada es de 121°C y debe mantenerse la presión y temperatura mencionadas de 15 a 30 minutos, dependiendo del volumen del material a esterilizar. En el caso de líquidos se mantiene la temperatura durante 30 minutos. El agua desionizada, bidestilada o tridestilada que se utiliza para la elaboración de medios, es embotellada en frascos de 500 o 1000 ml. dependiendo de las necesidades del laboratorio y en los frascos se coloca una aguja hipodérmica a través del tapon de hule, para que la presión interna del frasco escape y evitar con ello que el frasco explote (Fot. 4).

Para esterilizar instrumental de cirugía, ropa, material de cristalería, jeringas de plástico, cubrebocas, guantes latex, filtros millipore, sondas foley, etc. Se requiere mantener la presión y temperatura mencionadas durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se apaga el autoclave y se espera a que descienda la temperatura para que se pueda abrir el autoclave y así poder sacar el material y los frascos con el agua esteril, utilizando guantes de asbesto, evitando con ello quemaduras y quitando inmediatamente las agujas hipodermicas para conservar su esterilidad. Bajo este sistema no se debe esterilizar sondas Tygon y filtros Em-Com, ya que se desnaturaliza gradualmente el material con el que están compuestos.

Calor Seco

Aire Caliente.- Se realiza en una cámara hermetica llamada Horno Pasteur, que se puede comparar con un horno domestico, en el debe alcanzarse una temperatura de 250°C a 300°C durante dos horas, un requisito indispensable es que el aire caliente circule por cada objeto a esterilizar, destruyendo totalmente a los microorganismos esporulados como los no esporulados del material que va estar en contacto directo con los embriones. El Horno Pasteur es ampliamente utilizado en la esterilización del material de cristalería y metalico (frascos, vasos precipitados, matraces, pipetas Pasteur, material de cirugía). No es recomendable utilizarlo para sustancias liquidas y sólidas como el algodón, telas, plásticos, papel. Estos



Fig. 1. Vista desde el interior de un apartamento en un edificio de apartamentos en un barrio de la ciudad de Nueva York.

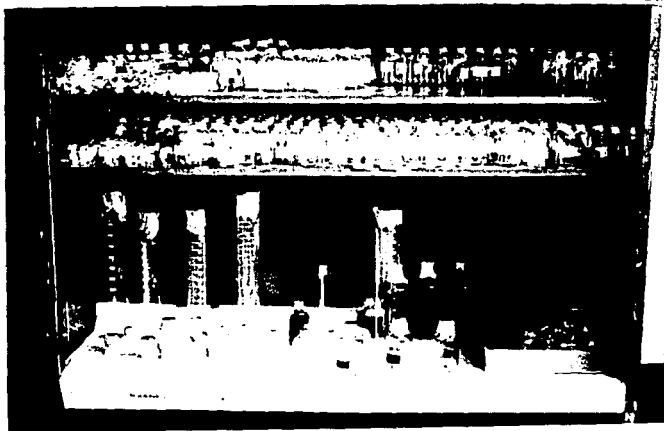


Fig. 2. Vista desde el interior de un apartamento en un edificio de apartamentos en un barrio de la ciudad de Nueva York.

materiales tienden a deteriorarse por falta de humedad (se deshidratan), e inclusive se carbonizan, ya que el material no permanece en un estado humedo durante el proceso de esterilización como sucede con el autoclave (Pot. 5 y 6).

3.2.- Filtración.

Es la remoción mecánica de los virus y bacterias presentes en una sustancia líquida, para esto se utiliza un tamiz con poros de un diámetro de menor tamaño al de los microorganismos que se desea remover, por ejemplo de : 0.22 y 0.45 micras de diámetro, dando buenos resultados de resistencia y esterilidad. Los de 0.22 micras se utilizan para la filtración de los medios utilizados para los embriones. Hay filtros desechables y hay otros que se vuelven a utilizar, sólo cambiando su membrana que puede ser de teflon o de nitrocelulosa. La membrana o tamiz se coloca de la siguiente manera: la cara brillante y lisa hacia arriba y la cara aspera hacia abajo ya que de colocarse en una forma contraria se saturan los poros. Los filtros que se pueden reciclar se deben esterilizar en autoclave.

3.3.- Radiación

La radiación es energía que viaja a través del espacio o bien es el fenómeno natural y que consiste en la facultad que tiene algunos átomos de desintegrarse al azar, dando origen a un átomo de otro elemento

Ionización.

Es consecuencia de una colisión entre la radiación ionizante y la materia. Por ejemplo, una partícula golpea al electrón de otro átomo y puede expulsarlo de su órbita, creando un electrón o protón libre. La ionización es importante para el género humano, porque los iones pueden iniciar reacciones químicas en los tejidos vivos.

Existen dos grupos:

- Ionizantes (Alta Energía).
- No Ionizantes (Baja Energía).

Solo se mencionara los rayos de tipo Ionizante.

Este tipo de radiaciones son de corta longitud de onda y actúan ionizando moléculas a su paso. Son altamente letales debido a su efecto en el DNA. Ejemplo de este tipo de radiaciones son los rayos Alfa (α), Gama (σ), Beta (β) y Equis (x).

Los rayos que se emplean para la esterilización del material utilizado en la transferencia embrionaria y con los cuales se han obtenido buenos resultados son con los rayos gama.

Rayos Gama (σ)

Son partículas más pequeñas que las ondas electromagnéticas, con mayor energía que los rayos X y que atraviesan el cuerpo humano. Además no tienen cargas eléctricas, por lo que estas radiaciones no se desvían y se emplean en la esterilización de medicamentos, jeringas, sondas, guantes de cirujano, líquidos,

alimentos. La emisión de estos rayos solo es detenida por una barda de concreto de 1.5 mts., de ancho, o bien con una barrera de plomo de 22 cm como mínimo de espesor. Los rayos gama son los ideales para la esterilización del material utilizado en la transferencia embrionaria, por ejemplo: jeringas de plástico, sondas Foley, sondas Tygon, filtros millipore, filtros Em-Com, fundas de inseminación, tapones de plástico, etc. La radiación óptima y necesaria para el material es de 1.75 a 2 megarats, con esta intensidad tenemos buenos resultados en la esterilización del material. Se debe de tomar en consideración que el material puede cambiar, de acuerdo a su:

1.- Color

Dependiendo de la intensidad de los megarats, con el cual es irradiado el material. Cambiando el color de amarillo a negro

2.- Resistencia

Con un número repetido de radiaciones y con un bombardeo mayor de megarats, el material sufre cambios en su estructura quebrándose finalmente.

Con el (Co 40), se obtienen los siguientes resultados:

1.- El poder de penetración de la radiación hacia el material es total.

2.- El poder residual de la radiación en el material plástico y de vidrio es nulo, lo que no sucede con el material metálico.

ya que este se comporta como un hisopo radiactivo, que es perjudicial para los embriones como para el personal técnico. Por consiguiente hay que tener cuidado de no enviar este tipo de material a irradiar, como por ejemplo: las fundas de transferencia embrionaria, que tienen una punta de acero inoxidable.

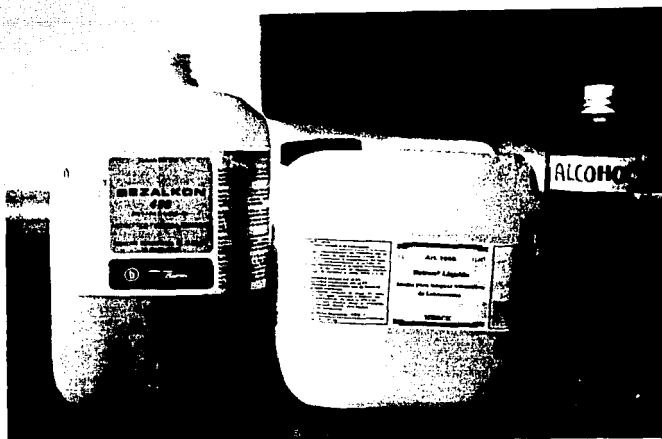
Métodos Químicos para la Desinfección de Material

Desinfectantes

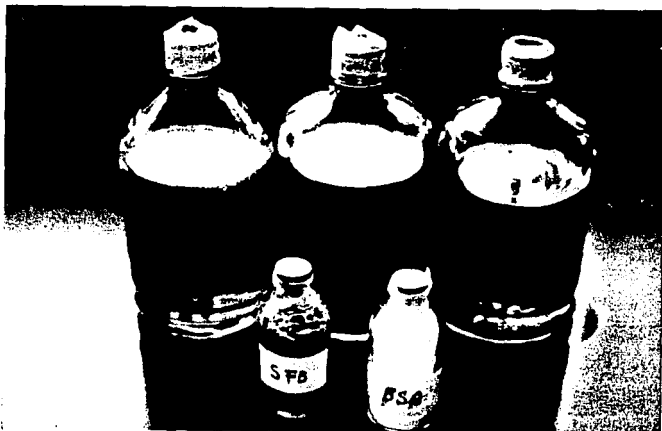
Cloruro de Benzalconio.- Tiene efecto antiséptico, es un detergente catiónico (inverso con cargas negativas), agente surfactante, provoca que exploten las bacterias porque el detergente actúa a nivel de la tensión superficial, cambiando la permeabilidad de las membranas.

Mejora su acción en medio alcalino, pero disminuye en presencia de jabones normales, sangre, proteínas, materia orgánica y pus. Actúa sobre Gram (-) y (+), tiene poco efecto sobre los virus. Se utiliza principalmente para la desinfección tópica de tejidos orgánicos.

Alcohol.- Empleado como antiséptico desinfectante y como solvente de otros antisépticos. Actúa desnaturalizando las proteínas bacterianas, potencializando su acción, si se diluye con agua de cualquier tipo en una concentración del 60% al 70%. Las bacterias sensibles son las Gram (+) y (-) como



Fot. 7. Sustancias químicas utilizadas para la limpieza y desinfección de material.



Fot. 8. a) Medio de PBS listos para su uso en la colección embrionaria y lavado de filtros Em-Com. b) Frascos con Suero Fetal Bovino (SFB). c) Frasco con Albumina Serica Bovina (BSA), sustancias que sirven como nutrientes y antiadherentes.

ácidos resistentes, las esporas bacterianas son las que resisten a la acción del alcohol.

Detergentes.- Son agentes de baja tensión superficial, los cuales aumentan la permeabilidad de la membrana celular facilitando de este modo que el agua penetre al interior de las bacterias hasta que estallen. Todos los agentes catiónicos inhiben la respiración o la producción ácida de los microorganismos (Pot. 7).

Técnica de Preparación de Medios

En la técnica de transferencia embrionaria es fundamental una buena elaboración de los medios que se van a utilizar para la recolección, manipulación, congelación y descongelación de embriones. Hay una gran variedad de soluciones salinas fisiológicas que se han utilizado obteniendo buenos resultados con el medio modificado de Dulbecco (PBS) que contiene las características más apropiadas para mantener la calidad y estadio o bien favorecer el desarrollo embrionario (2,4,5,21, 30,31). Las siguientes características son las más importantes que deben contar los medios para su uso:

Temperatura: La temperatura ideal es de 37.5°C ya que la temperatura corporal de la donadora es la misma. El embrión puede soportar temperaturas de 25°C a 37°C sin que estos sufran cambios bruscos o shock térmico (2,5,14).

pH: Es el indicativo de acidez o alcalinidad de las

soluciones, el pH optimo para los embriones es de 7.2 a 7.6 aunque los embriones de bovino toleran desviaciones sustanciales de pH durante cortos periodos (2.5,14,30).

Osmolaridad: es la concentracion total de sales en una solución. La osmolaridad requerida por los embriones esta entre 270 a 310 miliosmoles por Kg. Las variaciones minimas causa daño irreversible para los embriones (12,30,31).

Toxicidad. La presencia de compuestos quimicos u organicos en los medios dañan o destruyen: incluso cantidades muy pequeñas de ciertos metales, como el plomo o mercurio perjudican irreversiblemente la viabilidad de los embriones, por lo consiguiente se recomienda que el laboratorio que provee el agua bidestilada o tridestilada cuente con un buen control de calidad.

Esterilidad: La soluciones deben estar libres de cualquier microorganismo, los embriones toleran e incluso pueden desarrollarse en presencia de bacterias, sin embargo el porcentaje de gestacion se vera drasticamente afectado. Por lo tanto es de suma importancia poner mucha atencion en el material utilizado para la preparacion de los medios. (2,5,30,31).

Nutrientes: A los medios se les adiciona proteinas que pueden provenir del Suero Fetal Bovino o de la Albumina Serica Bovina. La primera fuente es el suero del becerro recién nacido, de ternera o novillo. El suero tiene un complemento que daña al embrión y este se debe desinactivar a una temperatura

constante de 56°C durante 30 minutos en baño María, después se esteriliza con filtros millipore de 0.22 o 0.45 micras. También se utiliza para que la zona pelucida de los embriones no se adhiera a la superficie del material utilizado en todo el proceso embrionario (2,5,30,31).

Antibióticos y Antimicóticos. Se agregan con el fin de prevenir contaminaciones, generalmente se agrega Penicilina G Sódica Procainica, Estreptomicina y algún antimicótico. Se debe de tomar en consideración que los antibióticos están compuestos por sales, que pueden modificar la osmolaridad de las soluciones y por lo tanto, se deben de adicionar cuidadosamente (2,5,7,30,31).

Para la preparación de los medios se requiere de un local que tenga las características adecuadas de seguridad, funcionalidad e higiene que son las siguientes:

1. El cuarto que tenga de preferencia pisos y paredes lisas, sin esquinas para que no guarde polvo o suciedad.
2. La puerta debe de cerrar herméticamente, de tal modo que al preparar los medios no haya corrientes de aire.
3. Debe de contarse con una mesa en su interior forrada de formaica blanca o acero inoxidable para facilitar la higiene y desinfección.
4. Tendrán que contar las instalaciones con tomas de corriente eléctrica para el uso del microscopio, balanza o algún otro implemento del laboratorio, también contará con instalaciones

de gas para la utilización del mechero bunsen necesario para propiciar una área estéril de 15 a 20 cm de diámetro. En el caso de que se cuente con un flujo laminar, este se prenderá 2 horas antes de su uso.

5. Se debe evitar la luz solar en el área de trabajo.

El PBS Dulbecco's es la base para la elaboración de los medios y varía su uso al adicionarle diversas sustancias como son (Fot. 8):

Suero Fetal Bovino (SFB), Albúmina Sérica Bovina (BSA), Glicerol y Sacarosa.

Existen diversas presentaciones del PBS en el mercado:

1. Solución líquida.

2. En sobre, el cual contiene las sales en polvo y es fácil de diluir.

3. En un principio es posible y quizá más barato preparar el PBS que se utiliza para los embriones a partir de sustancias químicas básicas. Para su elaboración se requiere pesar estas sustancias en una balanza analítica y utilizar agua bidestilada o tridestilada estéril.

Cualquier error en la preparación de los medios afecta la viabilidad de los embriones, por lo consiguiente es más confiable adquirir soluciones comerciales listas para su uso.

4. Otra ventaja de utilizar el PBS es que no requiere de una atmósfera de CO₂ para mantener estable su pH en el medio ambiente, debido a que no está amortiguado con carbonatos.

5. Al PBS se le adiciona Rojo de Fenol, que es el indicador del pH del medio. Cuando el pH varia de un color violeta o a un color naranja es indicativo de alcalinidad o acidez del medio respectivamente.

Fórmula para la preparación de 10 lts. de PBS

Sustancia	Cantidad
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.32 gr.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.21 gr.
NaCl	80 gr.
K Cl	2 gr.
Na HPO ₂ 4	11.5 gr.
KH PO ₂ 4	2 gr.
Glucosa	10 gr.
Sulfato de Estrep.	.5 gr.
Piruvato de Na.	.36 gr.
Penicilina G Sodica.	1 mill/10 lts.
Rojo de Fenol.	50 mg /10 lts.

*Segun (21,23).

Metodologia para la elaboracion de medio

Si se utiliza PBS en polvo, la presentación comercial de las sustancias se encuentran separadas en dos sobres, uno contiene CaCl_2 y MgCl_2 y el otro sobre contiene el resto de las sales. Se mezclan por separado, debido al que el CaCl_2 es muy inestable y provoca que las demás sales se precipiten. Si se decide pesar las diferentes sales, se emplearan de la misma forma.

- 1.- Desinfectar las superficies de las mesas de trabajo, equipo y material con alcohol al 70% .
- 2.- Encender el Mechero Bunzen o el flujo laminar, este último dos horas antes como mínimo antes de iniciar la elaboración de los medios.
- 3.- El sobre que contiene al CaCl_2 y MgCl_2 se mezclan en un 20% del total del volumen a preparar agitando vigorosamente. el sobre que contiene las demás sales se diluyen en el 80% restante del volumen total mezclandolo vigorosamente.
- 4.- Una vez que se han obtenido estas dos diluciones, se procede a mezclarlas en una forma energética.

Teniendo el PBS reconstituido se empleara para:

- a) El lavado uterino, se emplean frascos de 500 ml para vaquillas y de 1000 ml para vacas.
- b) Lavados de filtros Emm-Com.
- c) Para la elaboración de medios de mantenimiento y lavado de

embriones.

d) Medios para la congelación de embriones.

e) Medios para la descongelación embrionaria.

a) El medio empleado para el lavado uterino se le adiciona .4% de Albumina Sérica Bovina ó 1% o 2% de Suero Fetal Bovino.

b) Para el lavado de los filtros solo se utilizará la Solución Salina Fosfatada (PBS), sin la adición de BSA o SFB, pues si se utiliza para tal fin produce una gran cantidad de espuma que dificulta la búsqueda de los embriones.

c) El medio de mantenimiento es el mismo que se utiliza para lavar las estructuras embrionarias que se van a congelar. A este medio se le adiciona .4% de BSA o 10% de SFB.

d) El medio que se utiliza para la congelación de embriones esta compuesto por PBS + .4% de BSA o 10% de SFB + 10% de glicerol.

La adición de antibiotico es de 100 000 U.I. de Penicilina G Sódica Procainica mas 50 mg. Sulfato de Estreptomcina por cada mililitro de medio preparado. Los medios una vez elaborados se mantienen a una temperatura de 37°C.

e) Los medios utilizados para la descongelación embrionaria se pueden elaborar por medio de dos tecnicas:

Formula empleada en el laboratorio para la elaboracion de medios que se utilizan en la descongelación embrionaria

Medio:	Glicerol	+ Sacarosa	+ PBS
			(.4% BSA o 10% SFB)
1	6%	.3 molar	"
2	3%	.3 molar	"
3	sin	.3 molar	"
4	sin	sin	"

*Segun (21,23,27,51).

Formula empleada en el campo para la elaboracion de las soluciones madre que se utilizan para la descongelacion embrionaria

Solucion Madre	Sustancia
A	90 ml de PBS + 10% de SFB o 100 ml de PBS + .4% de BSA
B	Con una jeringa de 30ml se toman 28 ml de la sol. A + 2 ml de glicerol.
C	En una jeringa de 30ml se agrega la sacarosa en polvo hasta la marca de 10 cm y se afora a 25 ml.

*Segun (21,23).

En el cuadro siguiente se indica como se mezclan las soluciones madre para obtener finalmente cuatro soluciones para la descongelación embrionaria

Sol. No.	Soluciones Madre		
	A	B	C
1	2 ml	12 ml	6 ml - 20 ml
2	8 ml	6 ml	6 ml - 20 ml
3	14 ml	-	6 ml - 20 ml
4	20 ml	-	- = 20 ml

*Segun (21,23).

Técnica de Colección Embrionaria

Los resultados obtenidos en investigaciones demuestran que el momento más indicado para realizar la recolección es entre el día 6.5 a 8 de iniciado el calor. debido al tipo de estructura encontrados en estos días, de otra manera se encontrarían embriones muy jóvenes o embriones eclosionados sin zona pelúcida. Además de que los embriones bajan del oviducto hacia el útero en el 4º y 5º día, por lo tanto si lavamos la vaca antes de este tiempo sería difícil de recuperar los embriones (3,7,30,31).

El método de recolección de embriones por la técnica no quirúrgica es actualmente la más empleada, ya que ofrecí más

seguridad a la donadora y puede ser recolectada en repetidas ocasiones.

Actividades: antes, durante y después de la colección embrionaria.

Antes de la colección embrionaria.

1.- La donadora permanecerá en una trampa especial, en la cual se le brinda comodidad y seguridad al trabajarla.

2.- El piso debe ser antirrapante y con una elevación anterior de 15°, con la finalidad de que las vísceras se retraigan hacia atrás y con ello facilitar la manipulación de los órganos genitales.

3.- La donadora una vez en la trampa, se sujeta del cuello con el fin de que este quieta y también se le pondrá un tubo en el tren posterior a la altura de la tibia para evitar que tire de patadas al técnico que realice la colección embrionaria.

Durante colección embrionaria.

1.- La donadora una vez dentro de la trampa, se lava el tren posterior con agua y jabón, eliminando por completo los residuos de estiércol.

2.- Se rasura el pelo a nivel de la última vértebra sacra y primera cóccigea.

3.- Esta región se lava y se desinfecta con benzal o alcohol al 70% y se aplica localmente 5 cm de lidocaína al 2% ó 3% epiduralmente.

4.- Una vez que haya quedado insensible esta region, se obtendra una disminucion de las contracciones rectales y se podra introducir la mano para extraer el excremento y asi se facilita la manipulacion de los organos genitales.

5.- Una vez evacuado el excremento del recto, se introduce la mano en busca del cervix y se desliza la mano por el útero llegando a la bifurcación de los cuernos uterinos y se deslizan finalmente los dedos hasta llegar a los ovarios.

6.- Una vez localizados los ovarios se palpan los cuerpos luteos existentes en el, para evaluar la respuesta de superovulacion.

7.- Los cuerpos luteos palpados, es un número aproximado de cuantos embriones se van a encontrar.

8.- Se prepara el sistema de coleccion embrionaria que consiste en una manguera Tygon y en un filtro Emm-Con, que antes de su uso, se enjuaga con PBS para evitar burbujas de aire en el sistema.

9.- El filtro Emm-Con se coloca en un lugar seguro, sombreado y protegido con una bolsa de plastico para evitar que se ensucie de estiércol.

10.- Se lava la region vulvar y se introduce la sonda Foley con un estilete de acero inoxidable, para darle rigidez y que facilite el paso por el cervix, primero se dirige la sonda hacia el cuerno donde hay una mayor respuesta a la superovulacion, despues se dirigira hacia el ovario con una

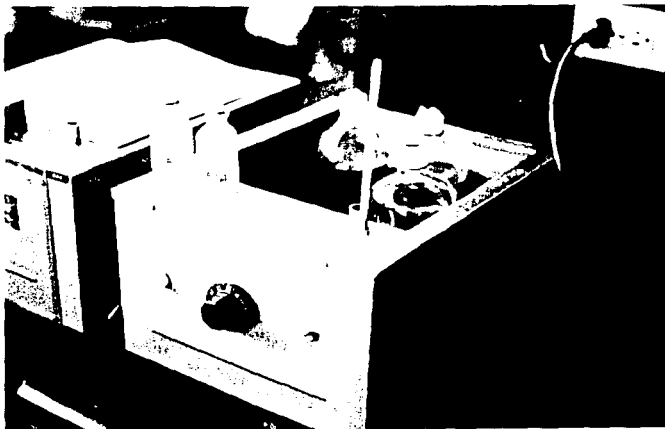


Fig. 9. The object being examined in the chamber. The object is a small, dark, irregularly shaped object, possibly a piece of material, being held by tweezers. The chamber is a large, rectangular metal box with a circular dial on the front. The power supply unit is on the right.

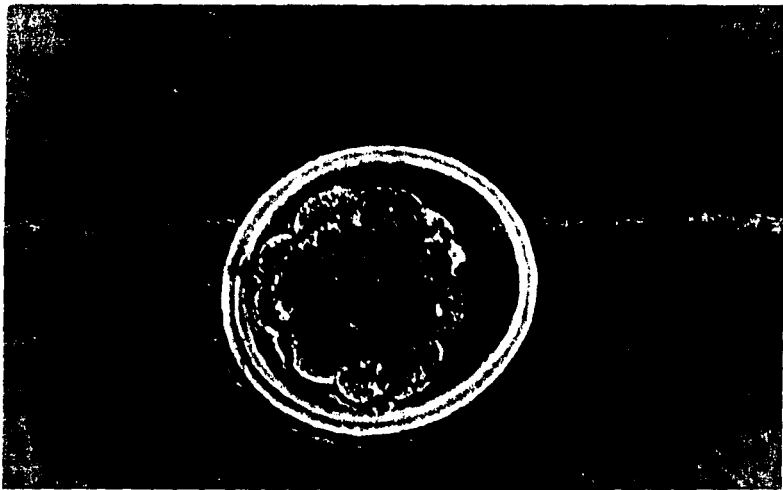


Fig. 10. The lens element.

menor respuesta superovulatoria.

11.- El globo del cateter Foley, se coloca en el tercio medio del cuerno uterino y se infla con 5 o 8 cm. de PBS o aire, teniendo cuidado de no inflar demasiado el globo ya que se lesiona la mucosa de los cuernos uterinos y se producen hemorragias.

12.- Tambien se revisa la posicion del globo si ha quedado fijo en el cuerno uterino, para que en el momento de la manipulacion no permita la salida del medio existente en el organo.

13.- Se saca el estilete y se conecta el extremo posterior de la sonda Foley al sistema de recoleccion.

14.- Los dos extremos restantes de la sonda Tygon se conectan; uno al frasco de PBS para efectuar el lavado uterino y el otro extremo al filtro Emm-Com.

15.- Para la coleccion embrionaria se necesita de 1 a 2 litros de PBS. La entrada del medio al cuerno uterino se regula por medio de un clamp y se introduce aproximadamente de 50 a 100 ml. de PBS por gravedad, la cantidad de medio tambien varia de acuerdo a la edad del animal, la raza y el tamaño de los cuernos uterinos (Fot. 9).

16.- El flujo de medio ocasiona que los embriones se desprendan del endometrio y tambien se realiza un masaje gentil con las yemas de los dedos en la union utero tubarica hasta el lugar donde se encuentra el globo de la sonda Foley.

17.- Se desaloja el líquido del cuerno uterino al abrir el clamp al mismo tiempo que se ejerce un masaje.

18.- El medio llega al filtro Emm-Com por gravedad, se debe evitar que el medio se derrame y de esa forma se pierdan los embriones.

19.- La operación se repite de 3 a 5 veces por cuerno, dependiendo del criterio del técnico.

20.- Una vez terminada la colección embrionaria de este cuerno se desinfla en globo y se introduce de nuevo el estilete, previamente desinfectado a la sonda Foley que se dirigirá ahora al cuerno donde se encuentra una menor respuesta de superovulación repitiendo la misma operación.

21.- Una vez terminada la colección embrionaria se saca el cateter Foley y junto con la manguera Tygon, se enjuagan con PBS hasta el Filtro Emm-Com.

Pasos a seguir después de la colección embrionaria:

1.- Una vez terminada la colección embrionaria se saca el cateter Foley y junto con la manguera Tygon, se enjuagan con PBS para que los embriones que se hallan quedado adheridos a sus superficies se desprendan.

2.- Una vez colectada la donadora, se le aplicará prostaglandina o algún análogo por vía intramuscular, para evitar que la donadora quede gestante.

3.- El filtro se desconecta de la sonda Tygon y se lleva al

DESARROLLO Y MORFOLOGIA EMBRIONARIA

La fecundación implica la penetración del espermatozoide al ovulo y el intercambio genético que ocurre entre ellos y después que se completa la singamia se inicia la partición del ovulo fecundado. las divisiones son sincrónicas en los primeros días y conforme avanza su desarrollo pierde esta característica. (7,14,24,31).

Desarrollo Embrionario

Tiempo	No. de células
36 - 48 horas de iniciado el estro	2 Células
3º día	4 - 8 Células
4º día	8 - 16 Células
4º - 5º día	Morula temprana (mayor a 16 células).
5º - 6º día	Morula compacta (32 a 64 células).
6º - 7º día	Blastocito temprano (160 células).
7º - 8º día	Blastocito temprano y blastocito expandido (aproximadamente 200 células).
8º - 9º día	Blastocito en eclosión (mayor de 200 células).

*Segun (19, 23, 39).

Conocimientos basicos de los diferentes estadios de desarrollo
del embrion al momento de la recoleccion

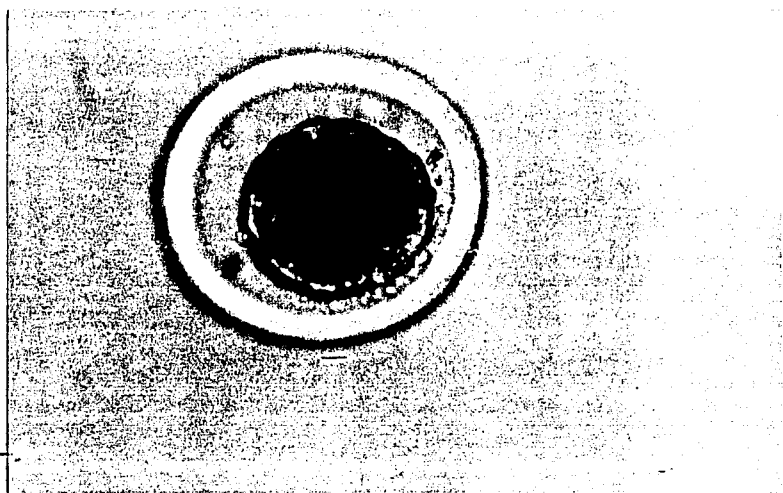
Solo se describen las estructuras embrionarias viables.

Morula temprana: se refiere a una agrupacion o masa de células que tienden a ser esfericas, en la cual la observacion individual de un blastomero a otro es visible, pero el conteo de las mismas se dificulta. La masa celular ocupa el 80% del espacio perivitelino (Fot. 10).. (6,7,21,23).

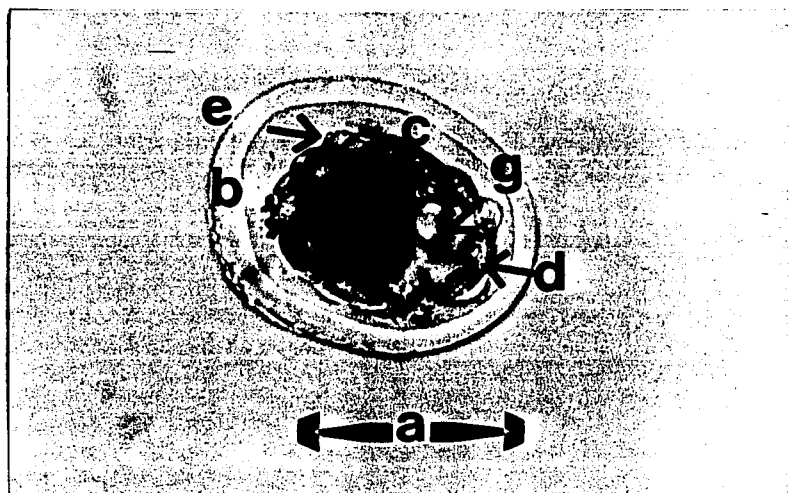
Morula madura: La principal caracteristica de este estadio es la compactacion de la masa celular y su forma esferica. La observacion individual de los blastómeros es imposible, la masa celular ocupa el 60% o el 70% del espacio perivitelino. (Fot. 11).. (6,7,8).

Blastocito temprano: Es un embrion que del estadio de morula compacta empieza a formar una cavidad interna ocupada por fluido conocido como "Blastocele". El embrion a la observacion tiene una apariencia de anillo y ocupa del 70% al 80% del espacio perivitelino. La diferencia visual entre trofoblasto y la masa celular es apreciable.

Blastocito: Se caracteriza por una pronunciada diferenciacion entre el trofoblasto (que se alarga y extiende en toda la periferia del embrion) y el disco embrionario que es una masa muy pequeña de color mucho muy obscuro y mas compacta. El blastocele abarca mas del 50% de la totalidad del embrion que ocupa el 90% del espacio perivitelino (Fot. 12).. (6,21,23).



Fot. 11. Mórula madura.



Fot. 12. Blastocito temprano.

Blastocito expandido: La principal característica observada en este estadio es el aumento considerable del diámetro del embrión, así como el adelgazamiento de la zona pelúcida (hasta un tercio de su grosor normal) y la ocupación del 100% del embrión en el espacio perivitelino (Fot. 13). En algunos casos se pueden coleccionar blastocitos expandidos que se colapsan con pérdida total o parcial del blastocelo, sin embargo su zona pelúcida queda sin modificarse (adelgazada) (6,7,37).

Blastocito en eclosión: En este estadio de desarrollo, el embrión tiene fisurada la zona pelúcida por donde eclosiona paulatinamente hasta salir totalmente de ella. El embrión puede tener ya sea la forma esférica de un blastocito expandido o bien estar colapsado (Fot. 14).. (6,21,23).

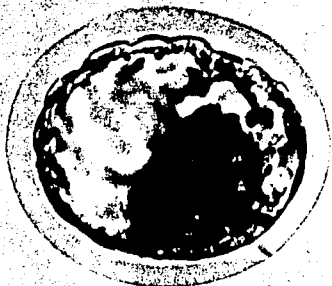
Morfología del Embrión

en el estadio de blastocito temprano

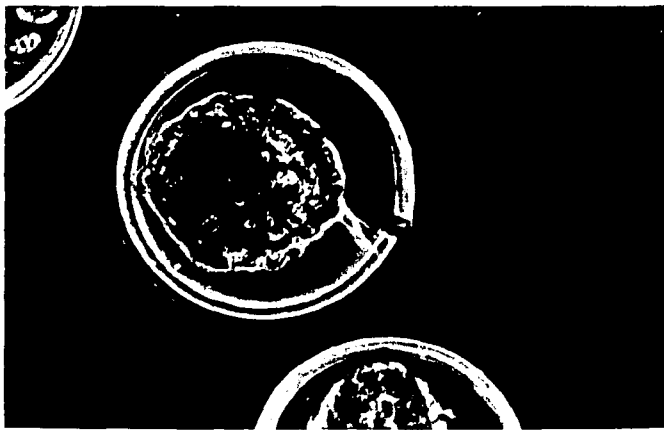
a) El embrión de bovino tiene un diámetro promedio de 150 a 190 micras (6,30,31).

b) La zona pelúcida está compuesta de mucoproteínas y tiene un grosor de 12 a 15 micras. Su función es proteger y aislar para proporcionar un microambiente especial a la masa celular embrionaria (30,31).

c) Espacio perivitelino. Es el espacio que hay entre la zona pelúcida y la masa celular y es aquí donde se crea el microambiente especial para el embrión (3,6,30,31).



Fot. 13. Blastocito expandido.



Fot. 14. Blastocito en ecloción

d) El trofoblasto esta compuesto por celulas diferenciadas aplanadas, las que van a dar origen a las membranas fetales del embrion (1.30.31).

e) Los blastomeros son la unidad funcional del embrion, su numero varia de acuerdo al desarrollo embrionario (1.2).

f) El boton embrionario o masa celular esta compuesta por blastomeros que daran origen al individuo mismo.

g) El blastocelo es un liquido producido por los blastomeros, el cual aumenta el tamaño del embrion rapidamente hasta que parece una esfera hueca (30.31).

Tecnica de Búsqueda, Manipulación y Evaluación Embrionaria

La evaluacion embrionaria es un punto importante en los resultados de gestacion de un programa de transferencia de embriones. Existen pruebas de laboratorio que nos indican la viabilidad del embrion, por ejemplo: exclusion de colorantes, medicion de actividad enzimatica y tinciones vitales, pero se necesita equipo especializado y cultivos prolongados para los embriones, lo que limita demasiado el trabajo de campo. Actualmente la evaluacion morfologica es la forma mas practica para determinar la calidad del embrion ; basados en los

porcentajes de gestacion obtenidos por embrion (3.7.9,11.30,31,37.39).

Una vez que entre el filtro al laboratorio, tambien debe

seguir un procedimiento adecuado para evitar confusiones y accidentes durante el manejo del filtro y por consiguiente con los embriones.

1.- Registrar el filtro en un listado que tenga los datos necesarios y adecuados (ver cuadro 1).

2.- Depositar los filtros en recipientes limpios y opacos para protegerlos tambien de los rayos solares.

3.- Se debe manejar el filtro con cuidado para no agitarlo y no producir una mayor cantidad de espuma que es ocasionada por la desnaturalizacion de la Albumina Serica Bovina (BSA) o Suero Fetal Bovino y que nos produce problemas para la busqueda de los embriones.

4.- Para un mejor seguimiento del filtro dentro del laboratorio como de las cajas de Petri, se recomienda poner algunos datos importantes en una tira de maskin-tape, que se empleara en algunos pasos del proceso embrionario:

- Numero de la donadora, raza y color del arete, abreviados.
- Numero o nombre del toro con el que fue inseminada.
- Registro de la donadora y equivalente maduro.
- Hora de llegada del filtro al laboratorio.
- Identificacion del filtro.

El maskin-tape se coloca en la tapadera de la caja petri de busqueda de 100 x 15 para evitar confusiones entre una y otra caja.

5.- Se identifican previamente las cajas petri de 100 x 15 y

35 x 10 con el numero correspondiente de la donadora, raza y color abreviados a un costado de las cajas y no en las tapaderas ya que estas se pueden cambiar entre una y otra, ocasionando confusiones.

Para llevar a cabo el lavado del filtro Em-Con, se debe de contar con el siguiente material:

1.- Se emplea Solucion Fosfatada Bufferada (PBS) que no contenga (BSA) o Suero Fetal Bovino, ya que esto ocasiona una mayor cantidad de espuma dificultando la búsqueda de los embriones.

2.- Se efectua el lavado con una jeringa automatica o desechable, la primera facilita el lavado y el manejo del filtro y con una aguja hipodermica de calibre 22 x 32, con la cual se ejerce la presion necesaria para el lavado del filtro sin dañar a los embriones.

El lavado del filtro Em-Con, se debe realizar de una manera rapida y eficaz asegurando con ello la integridad y supervivencia de los embriones.

1.- Se enjuaga la tapadera del filtro Emn-Con.

2.- Se destapa el filtro con cuidado.

3.- La parte interior de la tapadera se lava y se escurre con unos cuantos golpes dentro de la orilla del filtro.

4.- Se deposita la tapadera en un recipiente con agua para evitar que las sales y materia organica se sequen y sea dificil al lavarla.



Fot. 13. Forma de lavar la nave de carbón del filtro D-Com y de depositar el residuo en la caja de agua.



Fot. 14. Se encuentra un óxido en la cámara de combustión de la máquina tipo 7 que genera el ruido que ocasiona el escape de un humo de color característico.

5.- Se inclina el filtro y se abre el ciamp dejando escapar el medio a la mitad de la malla del mismo filtro.

6.- Se lavan las paredes y la parte libre de la malla donde no contiene liquido, barriendo hacia abajo los detritus, moco y coagulos donde pueden ir adheridos los embriones (Fot. 15).

7.- Una vez que aumente el nivel del medio en el filtro se abre el ciamp de nuevo, repitiendo la operacion cuantas veces sea necesario hasta obtener finalmente un medio cristalino, el cual facilita la busqueda de los embriones. Los embriones siempre deben permanecer con PBS en el filtro, para evitar cambios en la osmoralidad de los embriones.

8.- El medio se deposita en una caja Petri con los siguientes requisitos:

- Esteril.

- La caja debe ser previamente cuadriculada con cuadros de 1 cm de area que al momento de enfocar al microscopio estereoscopico a un aumento de 12x, abarque precisamente el area del cuadro. Recomendaciones y medidas de seguridad al depositar el medio en la caja Petri:

1.- No debe llenarse demasiado la caja para evitar que se derrame el medio y se complique su manejo. Con una cantidad adecuada de medio en la caja de Petri, se facilita la busqueda embrionaria y los embriones descienden en menor tiempo al fondo de la caja.

Se debe tapar la caja Petri, una vez depositado el medio

para evitar contaminación.

2.- No se deben tapar las cajas que contengan una excesiva cantidad de medio, ya que se corre el riesgo de que se adhiera a la superficie de la tapadera y se derrame provocando la pérdida de embriones.

3.- Al poner las cajas sobre las mesas de trabajo, en la platina del microscopio o al momento de moverlas de un lugar a otro, no se deben arrastrar sobre sus superficies, para no tirar el medio de la caja Petri.

4.- El transporte de la caja se efectúa levantando la tapadera en la parte superior de los dedos y la base de la caja que contiene el medio se toma con la parte inferior de los mismos dedos.

5.- Al transportar las cajas se deben poner toda la atención necesaria y no se deben manipular en una forma rápida.

La búsqueda embrionaria se efectúa de la siguiente manera:

1.- En una forma rápida y ordenada de arriba a abajo y de izquierda a derecha. Se utiliza una jeringa insulínica con una aguja hipodérmica de calibre 22 x 32 o 20 x 32 para mover los detritus y encontrar embriones ocultos en ellos, como también a la orilla de las cajas.

2.- En el momento de localizar una estructura embrionaria se introduce una pipeta Pauster con un diámetro de 250 a 500 μm con sus puntas previamente redondeadas para extraer a los.

embriones y depositarlos en la caja de Petri de 35 x 10 que contiene medio de mantenimiento.

3.- Una vez concluida la primera vuelta en la caja de búsqueda se realizara despues, una segunda busqueda pero antes de iniciarla se agita el medio con la pipeta Pasteur en una forma energica, sin tirar el contenido y se espera durante 2 ó 3 minutos, para que sedimenten los embriones. Al concluir la segunda vuelta se sigue el mismo procedimiento para que se realice una tercera búsqueda realizada por otro tecnico.

4.- Los embriones una vez recolectados en la caja de 35 x 10 que es la caja de mantenimiento se manipulan de la siguiente manera:

4.1.- Los embriones se reúnen al centro de la caja de Petri, teniendo cuidado de no dejar embriones a la orilla de la caja.

4.2.- Los embriones transferibles se separan por su estadio y calidad, de los no aptos para la congelación y la transferencia en fresco.

4.3.- Todas las estructuras encontradas en la caja de búsqueda se deben registrar en la hoja de recolección diaria.

4.4.- La evaluación se efectua en el microscopio estereoscópico a un aumento de 50x.

Para uniformar la evaluación de los embriones podemos apoyarnos en los siguientes parámetros.

1) Estado de desarrollo de acuerdo a la edad: El embrion

recolectado debe tener un estadio relacionado con el día en que se este haciendo la recolección es decir, que si se esta recolectando en el día 79, tendremos que encontrar morulas compactas, blastocitos jóvenes y blastocitos maduros. Cuauquier embrion que se encuentre en un estadio mas joven será un embrion retrasado (1-1.5 días) y esto limita los porcentajes de gestacion con este tipo de embriones.

2) Apariencia general: Cuando es de color ambar, está bien compactado con su zona pelúcida circular e intacta y con un desarrollo de los blastomeros uniformes y esfericos, por consiguiente es un embrion apto para transferirse.

3) Numero de células: Es importante contar, si es posible el numero de celulas, es decir que si un embrion tiene menos de 20 celulas al recolectarse al 79 dia es un embrion no transferible y cuando no se puede contar el numero de blastomeros, sin tomar en cuenta otras características morfológicas, es un embrion bueno para la transferencia.

4) Compactación de células: Las células del embrion (blastómeros) cuando están compactos, se notan apretados entre ellos, como en forma de mora y se notan los bordes de los blastomeros en la orilla. A diferencia de los embriones descompactados en los que se nota gran parte de cada blastomero y la separación entre ellos. Es importante la compactación porque va a permitir la nutrición entre los blastomeros y contribuirá a la formación de la cavidad del blastocelo.

5) Los blastómeros de forma y tamaño simétrico, cuando están bien compactados, sus células toman una forma poligonal.

6) Color: Los embriones deben tener un color uniforme. La presencia de manchas claras y oscuras indican la presencia de vesículas, que se asocian con problemas metabólicos, de igual manera cuando el embrión es muy claro. La presencia de vesículas es normal siempre y cuando no sean muy grandes y se localicen en embriones de estadios como blastocitos tempranos y blastocitos maduros.

7) Blastómeros extruidos: Los blastómeros extruidos son células que se quedaron en una etapa temprana de desarrollo y se notan como células grandes fuera de lo que es la masa del embrión, entre la masa y la zona pelúcida (espacio perivitelino), mientras más blastómeros extruidos tenga un embrión menor será su calidad.

8) Irregularidades de la zona pelúcida: Esto no causa ningún problema siempre y cuando esta irregularidad no sea la ruptura de la zona pelúcida, ya que un embrión que tiene la zona pelúcida rota no es aconsejable congelarlo, debido a que no soporta muy bien la congelación, pero esta condición en el embrión no le dará una menor calificación, pero la primera opción para este tipo de embriones sería transferirlos en fresco.

9) Presencia de restos celulares en el espacio perivitelino: La presencia de restos celulares nos indica el rompimiento de

membranas y de la degeneración de las células, dependiendo de la cantidad de este material, será el grado de degeneración del embrión.

Clasificación de embriones

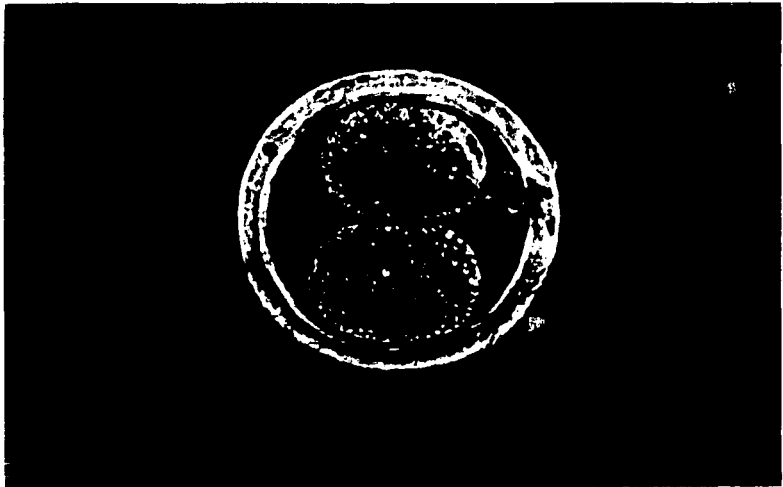
Los embriones pueden clasificarse en 4 grupos, que son los siguientes:

Excelente o calidad 1: Embrión compacto, esférico, desarrollo adecuado a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares, sin blastómeros extruidos (tal vez uno pequeño) y color ambar uniforme (20,36).

Bueno o calidad 2: Embrión compactado o con leve descompactación, poco irregular, desarrollo adecuado a su edad, presencia de vesículas pero no abundantes, con algunos blastómeros extruidos (uno grande o algunos pequeños), con pocos desechos celulares, color uniforme (tal vez poco oscuro o zonas claras u oscuras, pero no muy marcadas) (20,36).

Regular o calidad 3: Descompactación marcada, desechos celulares, blastómeros extruidos, color oscuro o con zonas claras y oscuras (presencia de vesículas), masa pequeña pero menor, al 50% de lo normal. Estos embriones de preferencia se transferirán en fresco, ya que no soportan satisfactoriamente la congelación (20,36).

No transferibles o calidad 4: Son los embriones no



Fot. 17. Estructura embrionaria no diferenciada, por lo que tiene un retraso en el desarrollo al producir sólo 2 blastómeros.



Fot. 18. La pipeta Pasteur es uno de los instrumentos con los cuales se puede manipular a los embriones, como se muestra en esta fotografía. La forma de pasar embriones de una gota a otra gota de PEG para efectuar el lavado de las estructuras embrionarias.

transferibles con marcada degeneración, masa pequeña menor al 50% de lo normal, descompactación, retraso en el desarrollo (mas de dos días), color obscuro, zonas claras y oscuras e irregularidades en los blastómeros (20,36).

Nota: Ovulos, embriones de 2 a 16 células y morulas tempranas serán clasificados como no transferibles (20,36).

Codificación

Para tener una forma sencilla de describir la evaluación de un embrión, se utilizan números de manera que podemos tener con 3 números la cantidad, la etapa de desarrollo y la calificación del embrión.

Codificación de las estructuras embrionarias

Estadio	Número	Calidad	Número
Ovulo	1	Excelente	1
Embrion de 2 a 16 células	2	Bueno	2
Mórula temprana	3	Regular	3
Mórula compacta	4	No transferible	4
Blastocito temprano	5		
Blastocito maduro	6		
Blastocito expandido	7		
Blastocito en eclosión	8		

*Segun (22,39).

Ejemplo:

Cantidad de embriones	Estadio	-	Calidad
1	(4	-	2)

Una vez concluida la evaluacion embrionaria, se manejan de la siguiente forma los embriones.

- 1.- Se utiliza una pipeta Pasteur esteril para lavar los embriones.
- 2.- Se utiliza PBS con 0.4% de Albúmina Sérica Bovina o con 10% de Suero Fetal Bovino (53).
- 3.- De la dilucion anterior, se toma con una pipeta Pasteur el medio necesario para formar 10 o mas gotas en la base de la caja Petri de 100 x 15.
- 4.- Una vez depositados los embriones en una gota, se procede a subir y bajar de 7 a 10 veces las estructuras embrionarias por medio de la pipeta para realizar el lavado de los embriones (53).
- 5.- Para pasarlos a la gota inmediata, es necesario tomar un poco de medio de esta y se extraen los embriones depositándolos en esta misma gota.
- 6.- Se repite la operacion cuantas veces sea necesario, para eliminar en su totalidad a los detritus aderidos a la zona pelucida (Fot. 18).
- 7.- Una vez lavados los embriones se van a colocar en gotas independientes, utilizando el mismo PBS esteril con la identificacion embrionaria correspondiente.

8.- La identificación se realiza, en una tapadera de una caja Petri escribiendo los datos abreviados de la donadora, raza y color del arete. También se identifica el estadio y calidad del embrión y el número de la pajilla que le corresponde (Fot. 19).

9.- Una vez colocados los embriones individualmente en cada gota se debe de tomar en consideración lo siguiente:

- Se verifica que los embriones se encuentren en el medio correspondiente.

- Solo se debe encontrar un embrión en cada gota y en el caso de que halla dos o más embriones se debe especificar previamente.

- Terminando la operación, se cubre la caja Petri para evitar que los embriones se contaminen. En todo el proceso embrionario las cajas Petri solo se deben abrir lo necesario.

- Al transportar la caja Petri se debe hacer con cuidado para evitar tirar o juntar las gotas que tienen a los embriones.

10.- La identificación de pajillas se realiza de la siguiente manera:

- Se toman las pajillas necesarias de 0.25 ml.

- Las pajillas nunca se deben de tomar de la punta ya que se contaminan y se ordenan colocando un trozo de maskin-tape sobre de ellas para evitar que se muevan al momento de identificarlas.

- Se colocan las pajillas sobre la superficie de la mesa en un papel absorbente y limpio, que no suelte pelusa.

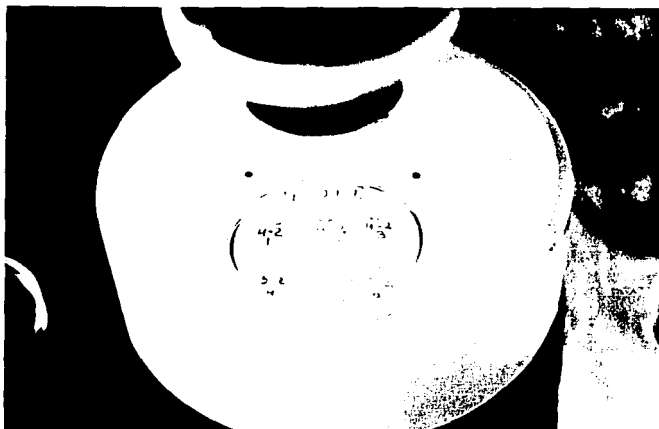


Foto. 19. Caja Petri con placa de agar donde se cultivó el Formo. Se identifican en las estructuras las colonias de este hongo.



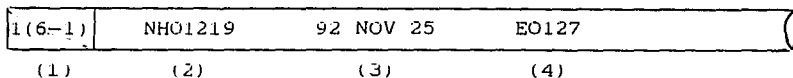
Foto. 20. Caja Petri con agar, con y para las de 3-10 ml. crecimientos identificables.

- Las puntas de las pajillas nunca deben tocar la superficie de la mesa de trabajo.

- La identificación de las pajillas se realiza con un marcador indeleble punto fino, en una forma ordenada, con letra clara y legible.

El orden de los datos en las pajillas de 0.25 ml. se sigue de acuerdo a las normas establecidas por las asociaciones Internacionales en Transferencia Embrionaria.

Por ejemplo:

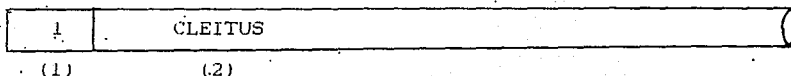


(1). Numero de embriones (Estadio-Calidad).

(2). Datos de la donadora: Color del arete, Raza y Numero del animal.

(3). Fecha de congelacion: Año, Mes (abreviados en Ingles) y dia de congelacion.

(4). Registro internacional del Centro de Transferencia Embrionaria



(1). Numero de la pajilla

(2). Nombre del toro o numero del toro.

Los embriones una vez evaluados, lavados y con su pajilla correspondiente, se procede a la congelación embrionaria (Pot. 20).

Se deben de tomar en consideración los siguientes puntos para facilitar el desarrollo de la técnica de congelación.

- El acondicionamiento del local para la congelación, con respecto a la ventilación, iluminación, limpieza y temperatura.

- En cada caja Petri 100 x 15 debe encontrarse como máximo 7 embriones con su gota correspondiente de PBS.

- Que el número de pajillas corresponda con el número de embriones que se van a congelar.

- Revisar que los datos de las pajillas estén en orden y que correspondan con los datos de la donadora, el estadio y calidad del embrión y con el número correspondiente de la pajilla.

- Antes de la congelación embrionaria, se debe de confirmar que los embriones se encuentren en su gota correspondiente de PBS.

- Los embriones deben de tener la zona pelucida perfectamente limpia.

- Se debe de contar con el material y equipo necesario para el proceso de congelación.

Técnica de Congelación Embrionaria

La calidad de los embriones para congelar es importante, porque determina la sobrevivencia a la congelación y también en la descongelación (52).

Principios básicos de congelación.

Para que el embrión sea capaz de congelarse, tiene que deshidratarse:

- 1) Por enfriamiento lento del embrión y medio.
- 2) Añadiendo sustancias químicas como glicerol y DMSO.

Si el embrión no se deshidrata al congelarse, se forman grandes cristales y estos a su vez romperán las membranas celulares, y por lo tanto producirán la muerte del embrión (50, 51).

Factores que determinan la salida de agua del embrión:

- 1) Formación del hielo.
- 2) Temperatura.
- 3) Concentración de sales y proteínas.
- 4) Propiedades osmóticas.
- 5) Características individuales de las células.

Formación del hielo: El embrión contiene 85% H_2O , el medio 90% H_2O . Inicialmente el agua es la primera en formarse en cristales dejando sales extras en las soluciones restantes entre los cristales de hielo, por lo tanto la solución es más concentrada.

Cristalización: Normalmente los cristales de hielo se observan a una temperatura de -3°C ; si ocurre un superenfriamiento los cristales se formaran a temperatura de -12 a -15°C y produciran daño irreversible al embrión, por la ruptura de las membranas celulares.

Para evitar lo antes mencionado, se deberá de inducir la cristalización a temperatura de -6 a -7°C , continuandose el enfriamiento, dejando sin congelar a la solución salada, la cual se vuelve mas concentrada, por lo tanto el agua sigue saliendo y el embrión se deshidrata. Para evitar el daño que ocasiona la solución concentrada en sales al embrión, es introducida la pajilla inmediata de los -30°C a nitrógeno líquido, produciendo así una cristalización rápida de líquidos y sólidos restantes (varios).

Presión Osmótica: El movimiento del agua, entre las membranas de las células es producido también por la presión osmótica de las soluciones. El agua atraviesa más fácilmente la membrana celular que las sales. El medio del embrión deberá contener de 270 a 320 mosm por kilogramo de NaCl .

Rangos de temperatura: Deben de ser lentos para permitir el tiempo necesario para que el embrión se deshidrate.

Crioprotectores:

Glicerol.- Intracelular o permeable (36,51) :

DMSO.- Intracelular o permeable (36,51).

Sacarosa y Proteínas.- Extracelular o impermeable (36,51).

Funciones del crioprotector:

1) Disminuye el tiempo de congelación para permitir al embrión

que se deshidrate (26,35,51).

2) Diluye la concentracion salada que queda de la deshidratacion, evitando el daño a las membranas celulares (26,35,51).

3) Interaccion en las membranas celulares y proteccion de las mismas en las etapas de solidificacion en la expansion y colapso del embrion (congelacion y descongelacion) (26,35,51).

Una vez que se hayan considerado los puntos mencionados anteriormente, se procede a la congelacion manual o se emplea una congeladora automática, con los siguientes lineamientos y criterios.

1.- Al emplear una congeladora manual o automatica, se sigue el mismo procedimiento en el proceso y manejo de los embriones para la congelacion, solamente varia, en que el tecnico especializado, lleva la congelación manualmente y si se efectúa la congelacion con una congeladora automatica es porque ya tiene un programa de congelacion integrado (26,27,37,38).

2.- Es importante tomar en consideracion el tiempo ya transcurrido desde que los embriones llegan al laboratorio hasta el momento de iniciar la congelacion.

2.1.- Se debe iniciar la congelación de los embriones dos horas antes, despues de haber llegado el filtro al laboratorio, pues el tiempo optimo para que los embriones conserven su viabilidad, esto se refleja en los porcentajes de gestacion.

3.- Antes de la congelación embrionaria se evalúan por una segunda ocasion para confirmar la evaluación morfológica de los embriones.

laboratorio con las medidas de seguridad e higiene que se describen a continuación:

- Manejar el filtro con cuidado para evitar que se nos caiga o se derrame el medio junto con los embriones.

- Proteger los filtros de los rayos solares al momento de transportarlo al Laboratorio.

- El exterior del filtro debe estar completamente limpio, por lo que se debe proteger con una bolsa de plástico evitando con ello que se ensucie y caiga materia orgánica (excremento) dentro del filtro.

- El filtro debe estar previamente identificado ya sea con números o letras y que corresponda con el número de la donadora, raza y color del arete para evitar confusiones entre las razas de los embriones.

- Se hacen notaciones en la hoja de colección diaria del laboratorio, al encontrar alteraciones durante la palpación del aparato reproductor de la donadora, como son:

- Malformaciones genéticas o congénitas.

- Píometra, salpingitis, costras, sangre fresca.

- Perforaciones en útero o cuernos uterinos.

- Adherencias en cervix, útero, cuernos uterinos, ovarios.

3.1.- Es conveniente realizar esta segunda evaluación, ya que el tiempo transcurrido en que se realizó la primera evaluación a la congelación en algunas ocasiones, es el tiempo suficiente para que algunos embriones cambien su estadio y calidad.

3.2.- Cuando hay dudas en el aspecto morfológico de los embriones cuando fueron observados a 50x aumentos, es conveniente confirmar la evaluación en el microscopio invertido de 200x a 400x aumentos.



Fot. 21. Medio que se utiliza para la conciliación embrionaria. Se depositaron una gota, en la caja de Petri junto a la gota de PBS, donde se encuentra el embrión.



Fot. 22. Se observa la forma de tomar la pajilla francesa de 0.20 ml. junto con la jeringa insulínica para empacillar a los embriones que se van a congelar.

Preparación del embrión para la congelación.

Una vez que se hayan considerado los criterios antes mencionados se procede a realizar la metodología en la congelación embrionaria.

1.- Una vez confirmada la evaluación del embrión, se pondrá junto a la gota de PBS donde se encuentra, una gota de medio de congelación (Fot. 21).

1.1.- Se toma un poco de medio de congelación de esta gota con la pipeta Pasteur y posteriormente se introduce a la gota donde se encuentra el embrión extrayéndolo y se deposita finalmente en la gota de PBS con glicerol. De esta manera se procura no cambiar la concentración de glicerol del medio de congelación.

1.2.- El embrión debe permanecer como mínimo 10 min. en el medio con glicerol. Que es el tiempo necesario para que el glicerol penetre dentro de las células del embrión.

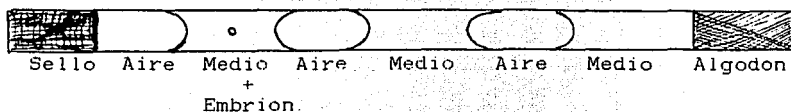
1.3.- No debe permanecer por más de 60 min. ya que en este caso el glicerol resulta tóxico para el embrión.

Llenado de pajillas de 0.25 ml.

1.- Se toma la jeringa insulínica y se adapta a ella la pajilla de 0.25 ml (Fot. 22).

2.- Se introducen las pajillas al medio de congelación y se succiona por medio de una jeringa insulínica, el medio para formar una serie de columnas, como se observa en la

siguiente figura.



Sellado de pajillas de 0.25 ml.

1.- Se realiza una presión mecánica en la punta de las pajillas con una piza Kelly o una pinza de disección, posteriormente se sellan con calor por medio de un sellador eléctrico.

2.- Antes de que se enfrien las puntas de las pajillas se deben de redondear con los dedos, las orillas de las pajillas, para que al momento de introducirías al barril de la congeladora manual no se atoren.

La preparación de la congeladora manual o automática se debe de realizar con anticipación para evitar que los embriones, permanezcan un mayor tiempo en el medio con glicerol.

Una vez que llegue a la temperatura inicial de 0°C, en este momento es cuando se introducen las pajillas, con el algodón de alcohol polivinílico hacia arriba.

Congelación Manual.

1.- Al introducir y manipular las pajillas en la congeladora manual o automática se debe realizar con cuidado para no agitarlas y provocar burbujas de aire.

2.- El barril se baja hasta el nivel numero 7 o 8 dependiendo del clima donde se lleve a cabo la congelación, y la temperatura descendera un grado por minuto hasta alcanzar la temperatura de -7°C (Fot. 23).

3.- Una vez alcanzada la temperatura de -7°C se saca el barril hasta el nivel 1, para mantener esta temperatura y se procede a la cristalización de las pajillas, se cristaliza la parte superior de la columna de medio donde se encuentra el embrion. Presionando con unas pinzas de disección la sección de la pajilla mencionada, hasta observar que se forma una pequeña porción de hielo (22).

4.- Una vez inducida la cristalización se dejara el barril con los embriones en el nivel 1 durante 10 min. Esto es con el fin de que la formación de hielo se efectúe lentamente, produciendo la deshidratación del embrion y de este modo no sufra cambios osmóticos bruscos, ni ruptura de membranas celulares.

5.- Cinco minutos después de la cristalización, se revisan las pajillas, para observar la formación de hielo en toda la columna donde se encuentra el embrion.

6.- Cuando sea necesario extraer las pajillas al medio ambiente, se debe realizar rápidamente sin exponer a las pajillas por más de 3 segundos.

7.- Transcurridos los 10 min. se baja el barril al nivel 5 ó 6 dependiendo del clima, donde se lleve a cabo la congelación y

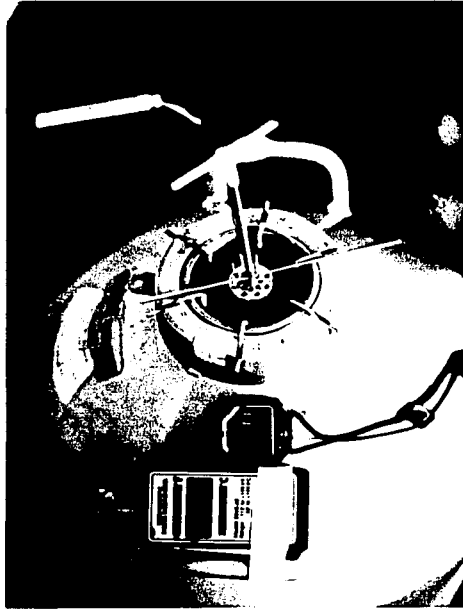


Fig. 22. Como se observa, el sistema de ajuste "normalizado" de la velocidad de avance de la máquina, que opera desde el "Módulo de base" proporciona una precisión.



Fig. 23. a) Panel de control de velocidad con el indicador de la concepción de velocidad de avance de la máquina. b) Controlador de la velocidad de avance de la máquina de tipo digital.

paulatinamente se va a disminuir 1°C por cada 2 minutos hasta alcanzar la temperatura de -30°C (22).

8.- Previamente los bastones deberán estar sumergidos en nitrógeno líquido, donde se depositan las pajillas con los embriones, una vez terminada la congelación a una temperatura de -30°C . Al pasar las pajillas de la congeladora a los bastones, no deben de exponerse las pajillas al medio ambiente por mas de 3 segundos, para evitar un choque termico que ocasiona la muerte de los embriones.

9.- Los bastones junto con las pajillas, se sumergén en nitrógeno líquido, alcanzando una temperatura de -196°C (22).

10.- El almacenamiento de los bastones se efectua en canastillas y termos previamente identificados para evitar confusiones.

Congelacion Automática.

1.- La congeladora automatica tiene una caja o compartimiento que se llena con nitrógeno líquido.

2.- Se prende la congeladora y se revisa el programa establecido de congelación (Fot. 24).

3.- Una vez que la computadora indique la temperatura de 0°C se introducen las pajillas con el algodón hacia arriba, y se presiona el botón de arranque, para que se inicie la congelacion.

4.- A la congeladora automatica solo se le verificara, el desarrollo del programa establecido.

5.- Cuando indique la congeladora automática, el término de la congelación se pondrá en práctica, los puntos 8 al 10 mencionados en la congelación manual.

6.- Una vez que los embriones se encuentren debidamente almacenados en los termos hay que revisar periódicamente los niveles óptimos de nitrógeno líquido y también que estén alejados de la luz directa del sol. Cualquiera temperatura inferior a -120°C no afecta la viabilidad de los embriones durante largos periodos, debido a que no ocurren reacciones térmicas a esta temperatura. El nitrógeno líquido es mundialmente utilizado para este efecto por su baja temperatura (-196°C) además de ser práctico y barato (45).

Técnica de Descongelación Embrionaria

Antes de iniciar la metodología de la descongelación embrionaria debemos considerar ciertos puntos importantes:

1.- La velocidad de descongelación, es tan importante como la de congelación ya que la supervivencia embrionaria depende de la combinación específica de ambas, por lo tanto, para descongelar es necesario conocer el método de congelación.

Cuando se hace una descongelación lenta (+ 20°C / min) los cristales aumentarán de tamaño provocando una recristalización, debido a la rehidratación de células, al descongelar rápido no hay tiempo para que ocurra este proceso, evitando así los efectos nocivos como son desorganización y muerte celular (40, 44).

2.- La selección del embrión a descongelar debe de corresponder con los días postcalor de la receptora.

3.- Una vez que se localiza el bastón en el termo se verifica la información del bastón y las pajillas.

4.- Las pajillas expuestas al nivel de la boca del termo no deben de permanecer por más de 3 segundos en este nivel.

5.- Los gobellets de los bastones deben estar llenos con nitrógeno líquido para la manipulación de las pajillas.

Técnica de descongelación

Existen varios sistemas para la descongelación de embriones. Heyman (1984) recomienda descongelar en agua a 37°C durante 15 minutos, mientras que Mapletoft (1987) cita a 35°C durante 40 segundos en el aire. Sin embargo, Schneider y Mazur (1984) sugieren descongelar en un baño de agua a 20°C por algunos segundos. Massip et al. (1987) indican la descongelación a 37°C en agua hasta que el hielo desaparezca.

Otro método de descongelación utilizado recientemente en Brasil y México, es el de descongelar a temperatura ambiente hasta que desaparezca el hielo, obteniéndose resultados desde un 30 a 40% de gestaciones.

El siguiente método de descongelación que reporta Peter Elsdén es el más utilizado en Estados Unidos y que actualmente se utiliza en México obteniendo un 70 a 80% de gestación.

Metodología.

- 1.- Se extrae la pajilla del bastón correspondiente y se expone la pajilla al medio ambiente durante seis segundos con movimientos giratorios.
- 2.- Se sumerge la pajilla al termo cafetero con agua a una temperatura de 37°C y aquí debe permanecer durante 20 segundos.
- 3.- Una vez transcurrido el tiempo indicado se extrae la pajilla del agua y se seca perfectamente con papel absorbente.
- 4.- Se verifican por segunda ocasión los datos de las pajillas

para evitar errores y para confirmar que es realmente el embrión necesario para la transferencia.

5.- En la platina del microscopio estereoscópico se coloca la pajilla y con movimientos giratorios se busca el embrión a 12x. La búsqueda previa del embrión en la pajilla es con la finalidad de ubicar y evitar la pérdida de las estructuras embrionarias ya que podría encontrarse en la punta de la pajilla al momento de cortarla.

6.- Una vez que se halla localizado el embrión se corta la pajilla al nivel de la mitad del algodón y después se corta la punta de la pajilla sujetándola de manera que no vibre y se pueda perder el embrión.

7.- Para retirar el crioprotector de las estructuras embrionarias se utiliza un método estándar, que es el remover el crioprotector gradualmente en diversos pasos, sumergiendo a los embriones en soluciones más bajas de glicerol en cada paso. Si se sumerge un embrión directamente a una solución de PBS más 10% de SFB, es afectado seriamente por el rápido influjo del líquido, cuando este fue congelado en una solución de 1 a 2 molar de glicerol. Se utiliza para remover el glicerol un soluto no permeable (sacarosa), el cual es añadido al medio para que el embrión se nutra progresivamente mientras el crioprotector deja al embrión. El uso de concentraciones de sacarosa, entre 0.25 y 1.08 molar ha sido probado con éxito. Dentro de los métodos de remoción del crioprotector el más

comúnmente utilizado es el convencional de cuatro pasos, que consiste en colocar los medios, para descongelar en una caja multiweldish en orden consecutivo.

Para que deicienda el embrion, de la pajilla al medio de descongelación, se coloca la punta de la pajilla en la superficie del medio numero 1 y se introduce el estilete por la parte superior de la pajilla para que corra junto con el algodón restante y se vacie el medio de la pajilla.

Se remueve el glicerol de la siguiente manera: en un medio de PBS + 10% SFB con 6.0% de glicerol y 0.3 molar de sacarosa durante 5 minutos como primer paso; enseguida se sumerge en medio de PBS + 10% SFB con 3.0% de glicerol y 0.3 molar de sacarosa por cinco minutos; posteriormente en medio de PBS + 10% SFB y 0.3 molar de sacarosa y permanece otros cinco minutos y finalmente cinco minutos en el medio de PBS + 10% SFB.

8.- Una vez que el embrion se encuentre en el medio numero 1 se puede evaluar, pero esta evaluación no es definitiva hasta que haya pasado por cada uno de los 4 medios y de haber transcurrido el tiempo necesario, se procede a la evaluación final y se empajilla el embrion con medio de PBS y 10% de SFB.

Para la evaluación embrionaria, a la descongelación existen varias técnicas que acontinuación se mencionan:

- 1) Midiendo el promedio de nutrientes.
- 2) Por tinción.

- 3) Por fluorescencia.
- 4) Evaluación morfológica a través del microscopio.
- 5) Por transferencia y esperar al Dx de gestación.

Tiempo optimo para la evaluación de embriones:

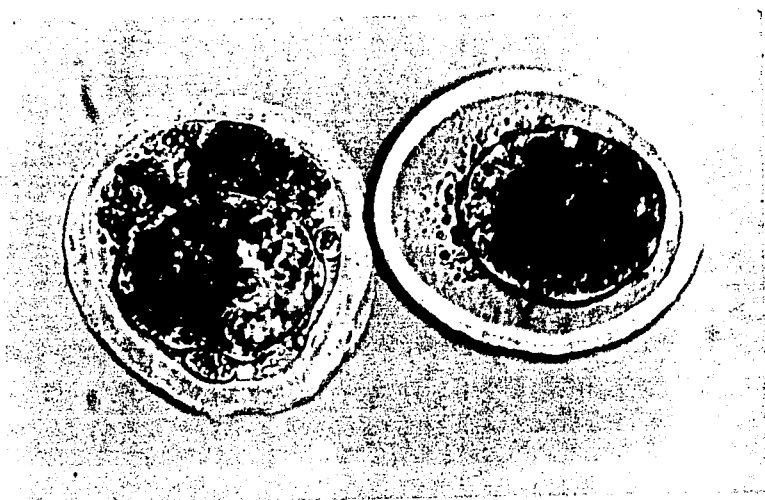
- 1) Inmediatamente después de la descongelación.
- 2) Después de remover el crioprotector.
- 3) Después de algunas horas de cultivo.

La evaluación morfológica a través de microscopio es la más práctica y se basa en (Fot. 25 y 26):

- 1) Color: más oscuro que el de un embrión fresco (incremento de células muertas).
- 2) Tamaño: más pequeño sobre todo en la cavidad del blastocelo.
- 3) Viabilidad: material extruido mayor que la masa del embrión, mayor inclusión vesicular, mayor daño al citoplasma, por lo tanto hay destrucción de organelos.
- 4) Compactación: Si se observa que las células permanecen sueltas y de forma redonda las membranas celulares fueron destruidas, por lo tanto el porcentaje de fertilidad será menor.
- 5) Apariencia: Se compara a la apariencia, antes de congelarse.
- 6) Zona pelucida: No significa daño del embrión necesariamente.



Fot. 25. Embrión descongelado, morfológicamente transferible.



Fot. 26. Embriones descongelados, morfológicamente no transferibles.

Causas de disminucion de la sobrevivencia embrionaria:

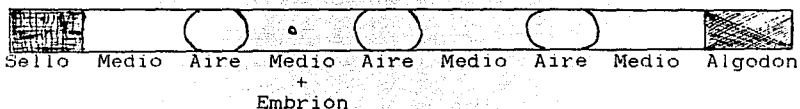
- 1) Pobre e ineficiente tecnologia.
- 2) Congelacion de embriones de pobre calidad y estadios inapropiados (morulas tempranas y blastosisto eclosionado).
- 3) Intervalo de tiempos entre la recoleccion y la congelacion (no menor de 2 hrs.).
- 4) Permanencia del embrion en glicerol (no menos de 10 min, y no mas de una hora), a temperatura ambiente.
- 5) Cristalizacion ineficiente.
- 6) Sellado de pajillas inadecuado.
- 7) Selecccion de moleculas (proteinas). La BSA son macromoleculas mas estables y puras que las de suero fetal bovino.
- 8) Mala programacion en los rangos de temperatura en las maquinas cogeladoras.
- 9) Mal funcionamiento de las maquinas congeladoras.
- 10) Posicion inadecuada del embrion dentro de las pajillas.

Causas desconocidas.

- 1) Los embriones de ciertas donadoras, sobreviven mejor a la congelacion que otros de diferentes donadoras.
- 2) Embriones de calidad 1 y 2, algunas veces no sobreviven a la congelacion.

Una vez concluida la evaluacion, se empajilla el embrion en una pajilla de 0.25 ml. Montando la pajilla en una jeringa.

insulinica para poder introducir el medio y formar una serie de columnas.



Una vez empajillado el embrion, se revisa la pajilla en el microscopio estereoscopico a 12x y se busca el embrion, en la columna correspondiente.

Una vez la pajilla con el embrion, se introduce en un aplicador para transferencia embrionaria, despues se coloca una funda para transferencia y finalmente se protege con una camisa sanitaria.

Al transportar el aplicador de transferencia con el embrion, no se debe de agitar y se coloca debajo del brazo para conservar. la temperatura de 37°C.

Lesiones causadas por la congelación y descongelación.

Por ejemplo: Todos los blastocistos bovinos, congelados muestran algun daño al descongelarse, lesiones como vacualizacion de celulas, espacios extracelulares dilatados, restos celulares en el espacio perivitelino y aumento en el número de mitocondrias, así como ruptura o pérdida de la zona pelucida. Todas estas lesiones afectan significativamente la fertilidad (Esper, 1986). Estudios realizados por Elsdén et

al., (1982) concluyen que los embriones de mayor supervivencia son las mórulas, blastocistos jóvenes y maduros, por lo que es conveniente congelar embriones de 6.5 a 7.5 días de edad.

LITERATURA CITADA

- 1.- Arriola, B.J.: Aplicación Futura de la transferencia de embriones. Transferencia de embriones en el ganado bovino. México, 1985. 104-110. Dirección de Normatividad Pecuaria (S.A.R.H.).
- 2.- Armada, R.J., Ramírez, M.H., Rentería, F.J. y Porras, A.H.: Uso del suero de terneras irradiado con cobalto 60 en cultivos celulares primarios de embriones de polo y embriones de gato. Memorias de la Reunión de investigación pecuaria en México, 1985.
- 3.- Acorón, P.M.A.: Transplante de embriones ; selección y manejo. Transferencia de embriones en ganado bovino. México, D.F. 1985. Dirección General de Normatividad Pecuaria (S.A.R.H.).
- 4.- Acorón, P.M.A., Paredes, F.L.R., Cresco, G.F. y Rivera, S.R.: Determinación de la eficiencia de la solución Hartmann como medio para recolección y transferencia de embriones bovinos. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, 1987.
- 5.- Astiazaran, J.R., Tijerina, S. y Longoria, T. J. : Porcentajes de gestación con embriones de bovinos de buena y sobre calidad colectados y transferidos con solución Hartmann modificada. Memorias de la Reunión de investigación pecuaria en México, 1987.

- 6.- Austin, C.R. and Short, R.V. Reproduction in Mammals: Germ cells and Fertilisation. Cambridge University Press, 1970.
- 7.- Austin, C.R. y Short, R.V. Desarrollo Embrionario y Fetal. 2 ed. La Prensa Medica Mexicana. México, 1982.
- 8.- Betteridge, K.J. y Flechon, J.E.: Anatomía y Fisiología de embriones bovinos en la etapa de preimplantación. Theriogenology. Nº: 671-679 (1988).
- 9.- Britton, A. P., Johnson, N. H. and Miller, R. B.: Ultrastructure: assessment of a blastocyst recovered from a cow with subclinical purulent endometritis. Theriogenology. 29 : 671-679 (1988).
- 10.- Chavarria Carvajal, F.: La crioprotección en el congelamiento de embriones de vacuno. Avance Veterinario. 3 : 41-45 1987.
- 11.- Chen, S.S and Wrathbill, A.E.: The importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. Br. Vet. J. 145: 129-140, 1989.
- 12.- Cockcroft, P.D.: The principles of low temperature storage of bovine embryos in liquid nitrogen. Zimbabwe Veterinary Journal. 11:30-33 (1983).
- 13.- Chopin, D. and Procureur, R. : Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocyst: Effect of number of steps and total duration. Theriogenology. 21: 209. (1984).

14.- Darson, A. & Gould-Somers, M.: Reproduction, Sci., 33: 17-27 (1982).

15.- Donaldson, L.E.: Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. Vert. Rec. 117: 489-491 (1985).

16.- Donaldson, L.E.: Embryo transfer in cattle.

17.- Eleden, R.P. and Seidel, G.E. Jr.: Procedures for recovery, dissection, freezing and transfer of bovine embryos. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1985.

18.- Eleden, R.P.: Nonsurgical recovery of bovine embryo transfer 1986 short course proceedings. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, Co., 1986.

19.- Eleden, R.P.: Transferring bovine embryos, Bovine embryo transfer 1986 short course proceedings. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1986.

20.- Eleden, R.P.: Mexican Government uses embryo transfer to address production of national dairy herd. Theriogenology, 11: 47-48 (1989).

21.- Eleden, R.P.: Manual for embryo transfer. Peter Eleden and Associates, Fort Collins, Co., 1987.

23.- Elsdon, R.P. and Associates: Basic Protocol for Freezing mammalian embryos in the RPE Freezer. Elsdon, R.P. and Associates Fort Collins, Co., 1987.

25.- Elsdon, R.P. and Seidel, G.E.: Manual of Embryo Transfer procedures for cattle. Colorado State University, Fort Collins, Co., 1988.

24.- Esel, D. El proceso de la fecundación. Sci., 12: 60-71 (1979).

22.- Farnad, G.D.: Techniques of cooling embryos. In: Techniques for Freezing mammalian embryos. Albertus, G.D., Colorado State University, 20-26; 1986.

26.- Fragaza, E.S.: Transferencia de embriones en el ganado bovino. Memorias de Transferencias de Embriones en México. 68-81, 1985, México.

27.- Garcia, R.C.: Preparación de materiales para la transferencia de embriones en el ganado bovino. Memorias de la Reunion de transferencistas en México. 140-150, 1985, México.

28.- Goncalves, P.B.D., Gregory, R.M. and Rouriques, J.L.: The efficiency of two non-surgical techniques for bovine embryo recovery on days 6 and 7 of the estrous cycle. Theriogenology., 28: 25-32 (1987).

29.- Greve, E.: Practical aspects of embryo transplantation in cattle. Br Vet., 142: 228-232 (1986).

- 10.- Gutierrez, J.C. y Hely, L.: Centro de Información y Documentación Agropecuaria. Habana, Cuba. 1988.
- 11.- Hafez, E.S.E.: Transferencia de embriones. Reproducción e Inseminación artificial en los animales. 5 ed. Interamericana, México. 1986.
- 12.- Hutter, C.C. and Cabodanila, J.A.: Efectos del número de embriones bovinos transferidos sobre el porcentaje de preñez. Revista Argentina de producción animal. 6: 34-41 (1986).
- 13.- Hutter, C.C. and Cabodanila, J.A.: Desarrollo "in vitro" e "in vivo" de embriones bovinos congelados. Revista Argentina de producción animal. 6: 45-48 (1986).
- 14.- Klotzer, R.H.: La transferencia de embriones en vacas lecheras para acelerar la mejora genética de las manadas, que puede ofrecer la tecnología de los Estados Unidos de Norteamérica. El Campo. 64: 1146-1147 (1987).
- 15.- Leibo, S.P. : A one step method for direct non-surgical transfer of frozen thawed bovine embryos. Theriogenology. 1:770-772 (1984).
- 16.- Leitch, H., Kerr, M.A. y Burnside, E.B.: Impacto de la transferencia de embriones en la población holstein Canadiense. Memorias de la I era. Conferencia Internacional sobre ganado lechero, México 1985: 114-130.

37.- Linares, T.: Estudio morfológico de blastocitos de bovino por microscopía de contraste de fases. Theriogenology, 14: 74-78 (1980).

38.- Linares, T.: Estudio sobre el desarrollo temprano en vaquillas repetidoras y vaquillas vírgenes. Theriogenology, 17: 31-47 (1981).

39.- Lindner, G.M. and Wright, R.W.: Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology, 20 : 407-414 (1983).

40.- Lomo, G.S.: El transporte de embriones en la Unión Sanadora Regional de Nuevo León. Monterrey, 1987.

41.- Luciano, S.B.H.: Transplante de embriones de ganado suizo y será realizadas en México. U.N.A.M., México, D.F., 1988.

42.- Luca, L.J., Navida, H.N., Miranda, M.F., Lopez, S. y Vatar, A.A.: Transferencia de embriones bovinos congelados: comparación de tres métodos de eliminación del crioprotector. Veterinaria Argentina, 5: 274-278 (1988).

43.- Mahon, S.D. and Rawle, J.E.: The export of deep-frozen bovine embryos. Theriogenology, 27: 31-35 (1987).

44.- Nassif, A.: Direct transfer of frozen cow embryos. Vet. Rec. 115: 583 (1984).

45.- Maurer, R.R.: Freezing mammalian embryos: a review of techniques. Theriogenology, 2: 45-60 (1978).

46.- Meiton, A.A., Berry, R.O., Butler, O.D. The interval between the time of ovulation and attachment of the bovine embryo. J. Anim. Sci., 10: 595 (1951).

47.- Fickett, H., Humboldt, P., Jean, Guyot, N. and Nibart, N. Ausencia de la relación entre concentraciones de progesterona y tasas de gestación en las recolectoras de embriones congelados. Theriogenology, 215:21-29. (1986).

48.-Renard, J.P., Heyman, Y., Leymonie, P. and Plat, J.L. Sucrose dilution: a technique for field transfer bovine embryos frozen in straws. Theriogenology, 19:145-146. (1983).

49.- Rodriguez, A.M., De los Santos, V.S., Aspron, P.: Usos de la Transferencia de Embriones e Inseminación Artificial en la Inducción de Gestación Gemelares en Ganado Bovino Encastado de Cebu. Memorias de la Reunion de Investigación Pecuaría de México.

50.- Schneider, U. and Mazar, P.: Osmotic consequences of cryoprotectants permeability and its relation to the survival of frozen thawed embryos. Theriogenology, 21(1):62-70, (1984).

51.- Seide, Jr. G.F. and Elsdon, R.P.: Protocol incorporating current recommendations for freezing bovine embryos. In: Techniques for freezing mammalian embryos. Short course. Colorado State University, 84-85 (1986).

52.- Solano, R., Bernal, A., De Armas, R., Corral, J. y Holy, L.: Desarrollo de embriones bovinos congelados y descongelados.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

III Congreso Cubano de Ciencias Veterinarias, (1987).

73.-Tokeda, T.: Preparing cryoprotectans. In: Techniques for freezing mammalian embryos. Short course. Colorado State University, 13-19 (1986).

84.-Tervit, H.R. and Elden, R.P.: Development and viability for frozen thawed cattle embryos. Theriogenology, 15:395-400 (1981).