

01669
3
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMPARACION DE LOS PORCENTAJES DE FERTILIDAD DE EMBRIONES
DE BOVINOS EN ESTADIO DE MORULA Y BLASTOCITO CON LA TECNICA
DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS A NIVEL DE CAMPO
CON UN APARATO MANUAL.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL:
REPRODUCCION ANIMAL**

**P R E S E N T A :
M. V. Z. JOSE PEDRO CANO CELADA**

**Aseores: M. V. Z. Msc. Luis Ocampo Camberos
M. V. Z. Msc. Javier Valencia Méndez
M. V. Z. Jorge Avila García**

MEXICO, D. F.

1995.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TITULO DE LA TESIS:

COMPARACION DE LOS PORCENTAJES DE FERTILIDAD DE EMBRIONES DE BOVINO EN ESTADIO DE MORULA Y BLASTOCITO, CON LA TECNICA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS ANIVEL DE CAMPO CON UN

GRADO Y NOMBRE DEL ASESOR O DIRECTOR DE TESIS:

APARATO MANUAL.

M. V. Z. Msc. Luis Ocampo Camberos, M.V.Z. Msc. Javier Valencia Méndez
M.V.Z. Jorge Avila García.

INSTITUCION DE ADSCRIPCION DEL ASESOR O DIRECTOR DE TESIS:

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - U.N.A.M.

RESUMEN DE LA TESIS: (Favor de escribir el resumen de su tesis a máquina en 25 renglones a un espacio como máximo, sin salir del extensión de este cuadro.

El presente trabajo se realizó con el fin de comparar la fertilidad de embriones de bovino en estadio de mórula y blastocito congelados a nivel de campo con un aparato manual. El trabajo se realizó en la explotación "Casa Blanca" localizada en Acatzingo, Puebla. Se realizaron 387 transferencias de embriones de vacas donadoras de la Raza Pardo Sulzo Europeo. La colección de embriones se realizó por el método no quirúrgico. Inmediatamente después de la evaluación morfológica, los embriones fueron colocados en Dulbecco Fosfato Bufferado (PBS), adicionado con 10% de glicerol y se envasaron individualmente en pajillas de 0.25 ml. Una vez identificadas, se inició el proceso de congelación, el cual consistió en pasar de la temperatura ambiente al baño de etanol del congelador manual a una temperatura de -6°C ó -7°C ; después de la inducción de la cristalización permanecieron durante 10 minutos a -6°C . A partir de los -6°C el descenso de la temperatura se realizó a un ritmo de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta los -35°C , temperatura a la cual se sumergieron en nitrógeno líquido, en el que se almacenaron hasta su utilización. Solo se congelaron las mórulas y los blastocitos calidad 1 (Excelente). La descongelación se efectuó en cuatro pasos. Cabe aclarar que solamente se transfirieron embriones que al descongelamiento se clasificaron como de calidad 1 (Excelente). La transferencia de los embriones se llevó a cabo por el método quirúrgico a través de una incisión en el flanco del lado ipsilateral al ovario presentando cuerpo lúteo. Se transfirieron 387 embriones de los cuales 138 fueron mórulas y 249 blastocitos; el diagnóstico de gestación se realizó a los 45 días posteriores a la transferencia. El porcentaje de preñez obtenido con las mórulas y blastocitos fué de 58.69% y 53.41% respectivamente, sin que existiera significancia estadística (Ji cuadrada, $P > 0.05$). El índice de preñez total fué de 55.29%. Se concluye que al transferir embriones que al descongelamiento siguen conservando su calidad 1, no existe diferencia en cuanto a su fertilidad es costeable la técnica como una herramienta más para el mejoramiento genético de los bovinos.

LOS DATOS ASENTADOS EN ESTE DOCUMENTO CONCUERDAN FIELMENTE CON LOS REALES Y QUEDO ENTERADO QUE EN CASO DE CUALQUIER DISCREPANCIA QUEDARA SUSPENDIDO EL TRAMITE DEL EXAMEN.

FECHA DE SOLICITUD 12 Junio de 1995



FIRMA DEL ALUMNO

Acompaña los siguientes documentos:

- Nombramiento del jurado del examen de grado
- Aprobación del trabajo escrito por cada miembro del jurado.
- Copia de la última revisión de estudios

FALLA DE ORIGEN

A los Animales considerados no racionales y no humanos, por ser los seres vivos que por no poder hablar son los mártires de la humanidad. A la naturaleza, plantas, insectos y cualquier tipo de vida que por estar a expensas del hombre se están extinguiendo, y son la esencia de mi corta existencia. Deberíamos de cambiar este criterio mundial de mantener la naturaleza a expensas del hombre y volver a integrarlo al delicado equilibrio de la naturaleza, porque de lo contrario la extinción de la vida sobre el planeta Tierra es inevitable.

Cualquier niño al pisar un escarabajo destruye su vida, pero todos los científicos del mundo juntos no son capaces de crear esa vida.

FALLA DE ORIGEN

A Magali por su amor, ayuda, dedicación y paciencia.

A mi Madre y mi hijo Pedrito con todo mi amor y cariño.

Al Dr. Jorge Avila Garcia y Familia por su ejemplo y por haberme brindado todo el apoyo y las enseñanzas para culminar una etapa muy importante en mi vida.

Al Técnico especialista en Transferencia y Congelación de Embriones, Sr. Leopoldo Espinosa por su amistad y enseñanzas.

A mis Asesores y Jurado:

Dr. Luis Ocampo Camberos

Dr. Javier Valencia Méndez

Dr. Salvador Avila Tellez

Dr. Arturo Olguin y Bernal

Dr. Eduardo Posadas Manzano

Por su amistad, interés y aportaciones a mi vida Profesional.

CONTENIDO

	PAGINA
I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	3
1. MORFOLOGIA DEL EMBRION	9
2. CLASIFICACION DE EMBRIONES	11
3. TECNICAS DE SUPEROVULACION	12
4. PROGRAMAS DE SUPEROVULACION	17
5. TECNICAS DE COLECCION DE EMBRIONES	19
6. TECNICAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	20
7. VENTAJAS DE LA CONGELACION DE EMBRIONES	24
8. PRINCIPIOS DE CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES..	26
9. CAUSAS DE DAÑO EMBRIONARIO EN CONGELACION ...	36
10. PORCENTAJES DE FERTILIDAD	42
III MATERIAL Y METODOS	45
IV RESULTADOS	57
V DISCUSION	58
VI CONCLUSIONES	61
VII LITERATURA CITADA	66

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1. Fertilidad obtenida al transferir mórulas ó blastocitos congelados.....	64

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Pajilla de 25 ml con el embrión y pajilla de 50 ml para anotar datos.....	62
2. Aparato manual para congelación de embriones fabricado por N. S. Martin Co.	63

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PAGINA
1. Embriones transferidos y gestaciones logradas.....	65

FALLA DE ORIGEN

M.V.Z. José Pedro Cano Celada. Comparación de los porcentajes de fertilidad de embriones de bovino en estadio de mórula y blastocito, con la técnica de transferencia de embriones congelados a nivel de campo con un aparato manual.

Asesores: M.V.Z. Msc. Luis Ocampo Camberos, M.V.Z. Msc. Javier Valencia Méndez y M.V.Z. Jorge Avila García

I. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el fin de comparar la fertilidad de embriones de bovino en estadio de mórula y blastocito congelados a nivel de campo con un aparato manual. El trabajo se realizó en la explotación "Casa Blanca" localizada en Acatzingo, Puebla. Se realizaron 387 transferencias de embriones de vacas donadoras de la raza Pardo Suizo Europeo. La colección de embriones se realizó por el método no quirúrgico. Inmediatamente después de la evaluación morfológica los embriones fueron colocados en Dulbecco Fosfato Buforado (PBS) adicionado con 10% de glicerol y se envasaron individualmente en pajillas de 0.25 ml. Una vez identificadas, se inició el proceso de congelación, el cual consistió en pasar de la temperatura ambiente al baño de etanol del congelador manual a una temperatura de -6°C ó -7°C; después de la inducción a la cristalización permanecieron durante 10 minutos a -6°C. A partir de los -6°C el descenso de la temperatura se realizó a un ritmo de 0.5°C/min hasta los -35°C, temperatura a la cual se sumergieron en nitrógeno líquido, en el que se almacenaron hasta su utilización. Solo se congelaron las mórulas y blastocitos calidad 1 (excelente). La descongelación

se efectuó en cuatro pasos. cabe aclarar que solamente se transfirieron embriones que al descongelamiento se clasificaron como de calidad 1 (excelente). La transferencia de los embriones se llevó a cabo por el método quirúrgico a través de una incisión en el flanco de lado ipsilateral al ovario presentando cuerpo lúteo. Se transfirieron 387 embriones, de los cuales 138 fueron mórulas y 249 blastocitos; el diagnóstico de gestación se realizó a los 45 días posteriores a la transferencia. El porcentaje de preñez obtenido con las mórulas y blastocitos fue de 58.69 % y 53.41 % respectivamente, sin que existiera significancia estadística (J_1 cuadrada, $P > 0.05$). El índice de preñez total fue de 55.29%. Se concluye que al transferir embriones que al descongelamiento siguen conservando su calidad 1, no existe diferencia en cuanto a su fertilidad al ser transferidos. El porcentaje total de gestación encontrada en éste trabajo indica que es costeable la técnica de la transferencia de embriones congelados, y que prevalece como una herramienta más para el mejoramiento genético de los bovinos.

II. INTRODUCCION.

La transferencia de embriones constituye tan solo una parte de la biotecnología aplicada, en el esfuerzo por proveer de alimentos con un alto valor proteico como la carne y la leche, a una población creciente en una forma más eficiente, a nivel mundial. El desarrollo de la tecnología de la transferencia de embriones ha permitido a los investigadores de todo el mundo acelerar el proceso de mejoramiento genético de las especies en las cuales se ha utilizado.

La transferencia de embriones, permite mejorar la calidad genética del hato nacional reduciendo el intervalo generacional (25, 32) e incrementando la intensidad de selección (67) además ofrece perspectivas, muy atractivas como la inducción de gestaciones con embriones bipartidos ó sexados, aún en fase de desarrollo (26, 56, 66).

La consistencia en los resultados de la transferencia de embriones podría mejorar significativamente el estado de la industria de la transferencia de embriones bovinos, particularmente al permitir predicciones económicas confiables. El desarrollo de nuevas técnicas para mejorar las tasas de éxito en la transferencia de embriones implica, además de la gran cantidad de fondos requeridos, la necesidad de inferir a partir de la experiencia de grupos de científicos más que de individuos, el involucramiento de personas alrededor de la industria de la transferencia de embriones y principalmente los extensos periodos requeridos para la investigación (21).

FALLA DE ORIGEN

Los embriones pueden ser transferidos en estado fresco ó congelados. La congelación de embriones tiene como objeto detener el proceso de desarrollo de éstos sin que se afecte su viabilidad. Este método permite preservarlos durante periodos cortos o largos y posteriormente, una vez descongelados, transferirlos a las receptoras para que continúen normalmente su desarrollo (62).

Las primeras observaciones de congelamiento de tejidos vivos la realizó Pouget (14, 50).

La industria ganadera se revolucionó con el descubrimiento del glicerol como protector del espermatozoide para evitar el daño que se efectuaba durante el congelamiento. El uso del semen congelado para la inseminación artificial ha hecho posible el desarrollo de pruebas de progenie y el uso óptimo de sementales selectos genéticamente alrededor del mundo.

Chang y Smith reportan en las décadas de los cincuenta y sesenta que un porcentaje muy bajo de embriones continuó su desarrollo después de ser congelados y descongelados, reportandose fetos viables de conejo (1, 13, 63).

Los primeros informes publicados de alto éxito en el congelamiento y descongelamiento de embriones mamíferos fueron hechos por Whittingham, Wilmut y Rowson, informando los nacimientos de embriones de ratón congelados a -79°C (70, 75).

La mayoría de éste tipo de células se puede congelar solamente mediante la utilización de un crioprotector; substancia que protege a la célula durante el proceso de enfriamiento y congelación (46).

La concentración de ésta sustancia, varía desde 1.0 Molar (M), (40, 73), 1.5 M, (4, 72, 74), hasta 2.0 M (45, 57).

Se han congelado exitosamente embriones de rata, coneja, borrega, cabra, yegua y se ha experimentado con los de cerda (47, 76, 77).

El nacimiento de los primeros becerros como producto de la transferencia de embriones congelados y luego descongelados fueron reportados por Wilmut y Rowson (21, 75).

En ausencia de un crioprotector los embriones mamíferos no sobreviven a la disminución de la temperatura menor a -20°C , los crioprotectores más ampliamente usados son el Sulfoxido de Dimetilo (DMSO) y el glicerol; ambos penetran las células (57). Además se han utilizado el etilénglicol, el propilénglicol y el 1-2 propanediol (62).

Al principio de la conservación de embriones por congelamiento se utilizó como crioprotector DMSO, mediante la técnica de enfriamiento periódico (75, 76).

Usando Sulfoxido de Dimetilo (DMSO) como crioprotector, se observó que los embriones sobrevivían a la congelación a -196°C y -269°C , con un 35 % de desarrollo in vitro obteniéndose algunas preñeces. Estas observaciones se corroboraron ampliamente al poco tiempo, (71, 73, 75).

Jadkowski demostró en 1980 mediante marcación radioactiva del glicerol, que ésta sustancia protegía la célula durante los procesos de enfriamiento y congelación, penetrando en su interior. Heise y Gording lo demostraron con DMSO y glicerol (26, 38).

Desde el inicio del uso de la técnica de enfriamiento periódico acelerado en embriones vacunos, se ha generalizado el empleo de glicerol como sustancia crioprotectora. Mediante este método se pudo mejorar considerablemente el porcentaje de embriones vivos después del enfriamiento, congelamiento y descongelamiento (5, 6, 11, 26).

Gracias a sus propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas el glicerol y el DMSO penetran en la célula por difusión libre y solamente después de alcanzado el equilibrio químico, se inicia la acción protectora a la célula durante el congelamiento (14, 38, 46).

El congelamiento de una célula viva inducirá un complejo proceso fisicoquímico de transporte de calor y agua entre la célula y su medio externo. Los embriones solo sobreviven a la crioprotección en presencia de un crioprotector en concentraciones entre 1 y 2 molar (M). Durante la adición y dilución de un crioprotector penetrante al medio que rodea a la célula, ésta sufre cambios osmóticos aumentando su tamaño. Como consecuencia de lo anterior, si la adición ó particularmente la dilución del crioprotector se llevan a cabo inapropiadamente, se afectará la viabilidad de las células (64).

El descongelamiento en uno ó tres pasos con el uso de un compuesto no permeable como la sacarosa ha permitido un ahorro de tiempo y mejores resultados. Así al eliminar los crioprotectores intracelulares sin ningún aumento exagerado en el volumen celular del embrión, se mejoran los porcentajes de fertilidad (64).

Las aplicaciones prácticas de la congelación de embriones son bien conocidas, sobre todo cuando el número de embriones obtenidos es superior al número de receptoras disponibles ó, si por el contrario, las receptoras exceden al número de embriones.

La calidad y la etapa de desarrollo del embrión sometido a la congelación reviste de gran importancia, debido a que no todos los embriones que son recuperados de las hembras superovuladas son aptos para su congelación. Particularmente en la especie bovina, en la que el porcentaje de viabilidad después de la congelación puede variar entre 70 y 90 %. Esto ha sido demostrado por varios estudios (5, 49, 64, 69).

Los embriones que se deben congelar son de seis a ocho días de edad en estadio de mórula ó blastocito. Deberán congelarse solo embriones de buena ó excelente calidad pues la criopreservación parece más dañina para embriones de calidad deficiente (1).

Utilizando programas computarizados para la graduación paulatina del enfriamiento y descenso de la temperatura hasta el congelamiento de los embriones, se ha podido mejorar, tecnificar y racionalizar el proceso de congelación de éstos (14).

Hasler encontró que aparentemente el estadio del embrión influye en la fertilidad al ser transferidos inmediatamente después de la colección (frescos), la fertilidad fue mayor al transferir mórulas (77%) que con los blastocitos (75%) (36).

FALLA DE ORIGEN

Algunos investigadores han encontrado que tanto el estadio, como la calidad de los embriones que son congelados también tiene efecto sobre la viabilidad al descongelar, y sobre los resultados de preñez (28, 36).

Se consideró en éste trabajo que en estadio de mórula se obtienen menos porcentajes de fertilidad comparado con los estadios de blastocito, por lo tanto el fundamento era el de comparar los porcentajes de fertilidad de embriones de bovino transferidos en estadio de mórula y blastocito, congelados a nivel de campo con un aparato manual.

El objetivo en éste trabajo fue observar la fertilidad obtenida con embriones en estadio de mórula y blastocito congelados con un aparato manual a nivel de campo, comparándolos entre sí para establecer cuales de éstos ofrecen mayores posibilidades de fertilidad e incrementar la capacidad de desarrollo de embriones de mala calidad ya que con esto se puede incrementar la eficiencia de la transferencia de embriones.

1. MORFOLOGIA DEL EMBRION.

Austin y Short marcan que la mórula es una pelota compacta de células. Posteriormente en el blastocito comienza a aparecer una cavidad llena de fluido, ésta cavidad ó blastocele se agranda rápidamente hasta que el embrión semeja una esfera hueca. El blastocito tiene una capa periférica simple de células planas llamadas trofotodermo ó trofoblasto y una pequeña protuberancia de células a un lado de la cavidad central, llamada masa celular interna (Inner cell mass). Esta última es la que principalmente dará origen al organismo adulto, mientras que las células del trofotodermo formarán la placenta y las membranas embrionarias. En el blastocito se desarrolla una cavidad que comienza a formarse cuando no más de veinte a treinta células están presentes. Después de su expansión, el blastocito eclosiona y gradualmente se alarga hasta tener una longitud de 20 cm. antes de la implantación en la segunda ó tercera semana de gestación (2).

Se considera un embrión en estadio de mórula (mórula tardía compacta) cuando tiene aproximadamente 64 blastómeros, y éstos se han unido formando una masa compacta que ocupe del 60 al 70 % del espacio perivitelino (23, 29, 32, 36).

Un embrión en estadio de blastocito temprano posee una cavidad llena de líquido o blastocele, su apariencia general es de un anillo que ocupa del 70 al 80 % del espacio perivitelino y en el que se puede diferenciar entre el trofoblasto y la masa celular interna (23, 29, 32, 36).

Se denomina a un embrión blastocito cuando existe una pronunciada diferenciación de las capas trofoblásticas externa y mayor compactación de la masa de células internas, así como cuando el blastocele ocupa la mitad ó más del embrión (23, 29, 32, 36).

Se denomina a un embrión blastocito expandido cuando es más grande y adelgaza su zona pelúcida (2).

Entre los 6 y 9 días después del estro, los embriones se encontrarían en estadios de mórula temprana, mórula compacta aproximadamente entre 5 y 6 días, blastocito temprano entre 6 y 7 días, blastocito y blastocito expandido entre 8 y 9 días aproximadamente (12, 29, 32, 49).

2. CLASIFICACION DE EMBRIONES.

Para evaluar la calidad embrionaria se utilizan los siguientes parámetros: forma, color, número y compactación celular, tamaño del espacio perivitelino, número de células extruidas y degeneradas y número y talla de las vesículas (23, 54).

Los embriones se clasifican como calidad grado 1, 2, 3 y 4 de acuerdo al manual de la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) y solo servirán para congelar las dos primeras ya que son con los que se obtiene un porcentaje aceptable de fertilidad (23, 29, 54).

Se le designa a un embrión calidad 1, cuando es esférico, con células de talla, color y textura uniforme que tenga más del 98 % de las células de la masa celular aparentemente activas y sanas y que presente blastómeros extruidos (23, 29).

Los de calidad 2, cuando tienen del 70 al 98 % de las células de la masa celular aparentemente activas y sanas, con pocas imperfecciones triviales, como escasos blastómeros extruidos, ligera forma irregular y con pocas vesículas (23, 29).

La calidad 3, cuando tienen menos del 70% de las células de la masa celular aparentemente activas y sanas, problemas definidos pero no severos, como presencia de blastómeros extruidos, vesiculación y algunas células degeneradas (23).

La calidad 4 ó degenerado, cuando existen numerosos blastómeros extruidos, células de tallas variables y/o degeneradas así como numerosas y grandes vesículas (23, 29).

3. TECNICAS DE SUPEROVULACION.

Debido a algunos problemas asociados con la fertilización in vitro en los animales domésticos, la superovulación es una de las técnicas disponibles para la obtención de un elevado número de embriones. En el ganado lechero la superovulación se ha realizado tradicionalmente mediante la utilización de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), extracto pituitario anterior de caballo (HAP), la hormona foliculo estimulante (FSH) y otras (9, 30, 51, 61).

Existen diversos programas de superovulación en el ganado bovino, basados en la aplicación de FSH, FSH y LH y Prostaglandinas (16, 31, 33, 52, 60, 61).

Las prostaglandinas PGF₂ alfa y sus análogos han simplificado la metodología de la superovulación, ya que la mayoría de las donadoras superovuladas manifiestan estro a las 48 horas de la aplicación de la PGF₂ alfa, su uso permite que el tratamiento se inicie en la fase lútea del ciclo estral, además de permitir un mayor control en el momento del estro y la ovulación y por lo tanto un mayor número de embriones (7).

Gonadotropina del Suero de Yegua Preñada (eCG).

El descubrimiento de ésta hormona, aportó un gran recurso a la superovulación, al favorecer el desarrollo y maduración de mayor número de folículos e incrementar la tasa de ovulación (15).

FALLA DE ORIGEN

Esta hormona ha sido ampliamente utilizada debido a que sólo se requiere de una aplicación, dada su prolongada vida media de actividad biológica. La dosis varía de 1,500 a 3,000 UI y se aplica por vía intramuscular durante cualquiera de los días, del noveno al doceavo día del ciclo estral. Generalmente 48 horas después de iniciado el tratamiento con PMSG se aplican 25 mg de PGF2 alfa, en una sola dosis. El celo se presenta dos días después de haberse inyectado la prostaglandina (22).

La desventaja de ésta hormona consiste en la variabilidad en la respuesta individual de las hembras tratadas, siendo los factores que pueden influir los siguientes:

a) Las preparaciones de PMSG varían considerablemente de lote a lote, tanto en potencia como en contaminación, además de no estar estandarizadas de acuerdo a las respuestas ovulatorias de las diferentes especies en las que son utilizadas (22).

b) Debido a su prolongada actividad biológica a menudo se producen muchos folículos desarrollados que no ovularán luteinizándose y posteriormente incrementando en forma anormal los niveles de esteroides al momento de la ovulación, lo que reduce la tasa de fertilización, así como el número de embriones normales desarrollados (22).

Dados los problemas encontrados por el empleo de la PMSG, se desarrolló un suero anti-PMSG, tratando de regular su actividad biológica, el cual al aplicarse 5 ml por vía intramuscular a 6 ó 12 hrs después de haberse detectado el celo a los animales tratados, incrementa el número de embriones transferibles, sin

modificar la tasa de recuperación de embriones ni la ovulación (26).

En la actualidad a la hormona PMSG también se le denomina Gonadotropina Coriónica Equina (Equine Chorionic Gonadotrophin, eCG).

Hormona Foliculo Estimulante (FSH).

Con esta hormona se han obtenido respuestas superovulatorias significativamente mejores, tanto en número de ovulaciones (las cuales se demostraron por la palpación rectal de los cuerpos lúteos) como en la producción de embriones viables. A pesar de ello al igual que la PMSG, la variabilidad en la respuesta ovulatoria a la FSH es grande e impredecible. La FSH se obtiene a partir de extractos pituitarios de cerdos u ovinos, envasándose en forma liofilizada (8).

La vida media de la FSH en el bovino es de 2 a 5 hrs, por lo tanto es necesario aplicar dosis repetidas de esta hormona para mantener niveles sanguíneos suficientemente altos, para estimular el desarrollo folicular (8).

Con la inyección subcutánea de FSH a intervalos de 12 hrs, durante 4 a 5 días, -iniciando el tratamiento en cualquiera de los días 9-14 del ciclo estral-, se obtiene un número adecuado de ovulaciones y embriones transferibles, tanto con el empleo de dosis decrecientes como con dosis continuas (8).

La dosis diaria y total de FSH varía ampliamente, la dosis total puede variar de 24 mg hasta 60 mg. Como regla general los animales jóvenes de 2 a 4 años y cruza de Brahaman requieren

dosis más bajas, mientras que las vacas más viejas (de 8 a 9 años) ó más pesadas (de más de 700 Kg). requieren dosis más altas. Es necesario establecer dosis individuales para vacas que son repetidamente superovuladas (8, 32).

La PGF2 alfa es administrada al tercer día del tratamiento con FSH, para asegurar un intervalo predecible entre la última aplicación de la gonadotropina y el estro. Este último se manifiesta 48 horas después de la inyección de PGF2 alfa, debido probablemente a los altos niveles de estrógenos en las vacas superovuladas. La dosis recomendada de prostaglandina es de 50 mg aplicada en dos dosis de 25 mg, con un intervalo de 12 horas (8, 22).

El inconveniente de la FSH desde el punto de vista práctico, es que requiere de un mayor número de aplicaciones, 8 a 10 inyecciones, más las de prostaglandinas, lo que supone un mayor manejo de las donadoras durante la superovulación (8).

Extracto de Pituitaria Anterior Equina (HAP).

El HAP ha demostrado ser eficaz en la superovulación bovina cuando se le administra una vez al día, durante 3 a 5 días. Al igual que con PMSG y FSH el tratamiento se inicia durante la fase lútea del ciclo estral y se aplica prostaglandina F 2 alfa al tercer día de la primera inyección de HAP. La respuesta con HAP es similar a la superovulación en vacas y vaquillas con PMSG. En comparación con la FSH, la respuesta con HAP es menor (8, 18).

FALLA DE ORIGEN

Gonadotropina Menopáusicas humana (HMG).

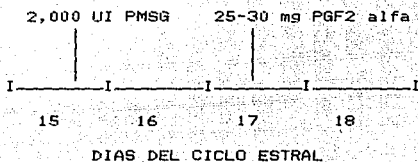
Esta hormona se obtiene de preparaciones purificadas de la orina de mujeres post-menopáusicas y envasada en ampolletas conteniendo 75 UI de FSH y LH. La HMG ha demostrado ser tan efectiva como la FSH. El tratamiento consiste en la aplicación subcutánea de dos ampolletas a las 0, 12, 24 y 36 hrs. en cualquier momento de la fase lútea. La prostaglandina F 2 alfa se aplica 72 hrs después de iniciado el tratamiento (8, 18, 59).

Sea cual sea la hormona empleada en la superovulación, se deberá mantener los controles más estrictos en su manejo y almacenamiento, ya que éstas hormonas pueden ser fácilmente inactivadas por microorganismos introducidos por agujas y jeringas no estériles, ó bien por no mantenerse en refrigeración una vez reconstituidas (8, 18, 59).

4. PROGRAMAS DE SUPEROVULACION.

Existen diversos programas de superovulación en el ganado bovino, a continuación se muestran algunos basados en la aplicación de FSH y Prostaglandinas (8, 51).

A) Aplicación de una dosis de 2,000 UI de PMSG seguida por la administración de PGF2 alfa (51, 60, 61).

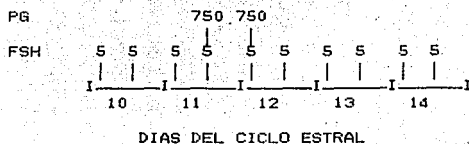


B) Aplicación dos veces diarias en dosis decrecientes de FSH durante 5 días combinadas con dos inyecciones de PGF2 alfa (51, 60).

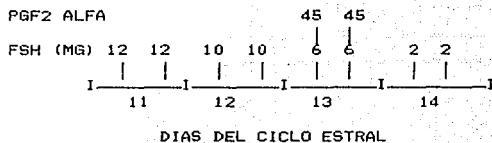


FALLA DE ORIGEN

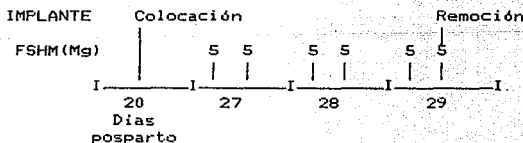
C) Aplicación de dosis constante de FSH dos veces al día durante cuatro días, combinada con PGF2 alfa (51).



D) Similar a B. pero usando dosis mayores combinadas con PGF2 alfa (16, 51).



E) En ganado bovino productor de carne con cría al pié, existe otro tipo de programa utilizando un implante (Norgestomet), previo a la superovulación por ejemplo:



Sin embargo no existe un consenso sobre cual combinación de tratamientos y dosis es la más efectiva para producir superovulación (51).

5. TECNICAS DE COLECCION DE EMBRIONES.

Se han descrito dos técnicas de colección de embriones, la quirúrgica y la transcervical.

Técnica de colección Quirúrgica:

Actualmente la recolección quirúrgica es una técnica poco usada, la obtención de embriones a través de laparotomía media lateral se recomienda en casos especiales, como por ejemplo cuando hay bloqueo de los oviductos. La incisión por el flanco es llevada a cabo con analgesia local. En general no se recomienda porque es difícil exponer el tracto reproductivo, produce más estrés y aumenta la posibilidad de crear adherencias o cualquier otra lesión en los órganos reproductivos (57, 60).

Técnica de recolección no Quirúrgica ó Transcervical:

Actualmente la recolección no quirúrgica ó transcervical es la técnica más usada. Esta técnica se describe ampliamente en el capítulo de material y métodos.

FALLA DE ORIGEN

6. TECNICAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

Existen tres técnicas de transferencia de embriones, dos quirúrgicas y una no quirúrgica (23, 67).

Las técnicas quirúrgicas han dado porcentajes más consistentes de preñez, sin embargo algunos técnicos obtienen los mismos porcentajes con el procedimiento no quirúrgico (23, 78).

Técnica Quirúrgica con Anestesia General.

Fue la primera técnica que se utilizó. Requiere aplicar anestesia general a la receptora, además de un equipo competente de anestesistas y cirujanos, buenas instalaciones y equipo, lo cual la hace poco práctica, por lo que actualmente solo se utiliza con fines de investigación (20, 23, 67).

Técnica de transferencia Quirúrgica.

Esta técnica consiste en una laparotomía por uno de los flancos usando tranquilizantes, y bloqueos, con la vaca de pié y puede ser realizado en clinicas de campo (20, 67).

Se tranquiliza el animal, y se realizan bloqueos epidurales, paravertebrales y regionales con procaína al 2 %, y antisepsia del área quirúrgica (20, 67).

Se hace una incisión de aproximadamente 5 cm en la fosa paralumbar a 3 cm de la tuberosidad coxal y 5 cm abajo de las apófisis transversas de las vértebras lumbares, del lado donde previamente se haya palpado el ovario con el cuerpo lúteo (20, 67).

La incisión abarca piel, tejido subcutáneo y músculo (20).

La hemostasis se hace por compresión, pinzamiento y ligaduras con suturas absorbibles de los vasos incididos (20).

El primer músculo a incidir es el oblicuo abdominal externo el cual tiene sus fibras dirigidas craneocaudalmente ligeramente ventrales, el músculo oblicuo abdominal interno que está en seguida, tiene sus fibras dirigidas craneocaudalmente y ventrodorsales, inmediatamente después se incide el músculo transverso abdominal que tiene sus fibras dirigidas ventro dorsalmente. En el fondo de la herida se aprecia el peritoneo de color blanco perlado (20, 67).

Se introduce la mano cubierta con un guante estéril por la herida y se localiza el cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo, y se extrae gentilmente (20, 67).

Se hace una pequeña punción con una aguja roma calibre 14, hasta llegar al lumen uterino (20, 67).

El embrión y el medio que lo preserva será colocado con anterioridad en una pipeta de punta roma, que puede ser de plástico o de cristal (20, 67).

Una vez colocada la punta de la pipeta a través de la herida del cuerno uterino, se deposita el embrión en la luz del órgano (20, 68).

Se deposita el útero dentro de la cavidad, en su lugar normal, con mucho cuidado (20, 67).

Se colocan los puntos en "X" que sean necesarios con Dexon del número 2 y que abarquen peritoneo y planos musculares (20, 68).

FALLA DE ORIGEN

La piel se sutura con puntos en "U", separados a una distancia de 1.5 cm entre uno y otro, empleando nilón del núm 1. También se pueden utilizar grapas (20, 67).

Se aplica un cicatrizante en la herida y se da seguimiento al evento post-operatorio (20, 67).

El diagnóstico de gestación se hace a los 45 post-trasplante días por palpación rectal (20).

Técnica de transferencia no Quirúrgica o transcervical.

Es la técnica que actualmente más se utiliza, para no exponer a la receptora a la técnica quirúrgica (55, 67, 68, 78).

Primeramente se inmoviliza al animal.

El procedimiento básico consiste en palpar rectalmente a la receptora y localizar el ovario con el cuerpo lúteo (67, 78).

Se aplica un bloqueo epidural, lavando con agua y cepillo la región comprendida entre la penúltima vértebra sacra y la cuarta ó quinta coccigea, se rasura y desinfecta el espacio sacro-coccigeo donde se administran de 4 a 6 ml de procaína al 2% (67, 78).

Previamente, el embrión y el medio que lo preserva se colocan en una pajilla francesa de 0.25 ml, la cual se introduce en una pistola francesa de Cassou modificada para transferencia de embriones, con salida lateral y protegida por una bolsa ó camisa sanitaria (67, 78).

Se lava y desinfecta la región perivulvar (67, 78).

FALLA DE ORIGEN

El asistente abre los labios vulvares para evitar que la pistola entre en contacto con ellos, una vez pasado el cervix se introduce la pistola al cuerno uterino del lado del cuerpo lúteo y se guía suavemente hasta el tercio anterior del mismo, teniendo mucho cuidado para no lesionar el endometrio. Una vez colocada la punta del aplicador en este sitio se empuja el émbolo para depositar el embrión (67, 78).

Se corrobora la transferencia por medio del diagnóstico de gestación en la receptora a los 45 días post-trasplante (55, 67, 78).

7. VENTAJAS DE LA CONGELACION DE EMBRIONES.

El congelamiento de embriones se ha convertido en una práctica muy común actualmente en la industria, sin embargo el equipo necesario permanece relativamente inaccesible debido a su alto costo. Esto, aunado a la tecnología que cambia constantemente que ocasiona que un equipo se vuelva obsoleto rápidamente, es necesario implementar técnicas menos costosas con aparatos manuales de congelación, para poder trabajar a nivel de campo.

Los embriones congelados ofrecen muchas ventajas:

1) No se necesita un rebaño de receptoras sincronizadas excedentes para transferirlos inmediatamente. Los embriones se pueden congelar para usos futuros lo cual reduce los costos, disminuyendo los gastos de alimentación y manejo (6).

2) Se pueden acumular una gran cantidad de embriones de diferentes tipos para ser usados en el lugar y tiempo adecuados.

3) La congelación permite la colección de embriones a todo lo largo del año.

4) Los embriones congelados están disponibles para la venta entre ganaderos ó compañías especializadas.

5) Los embriones no pierden viabilidad a través del tiempo siempre y cuando se mantengan en un termo adecuado y se sigan instrucciones similares a las del manejo del semen congelado.

6) La congelación de los embriones permite el transporte a diferentes partes del mundo, siempre y cuando hayan llenado los requisitos sanitarios.

7) La congelación abarata los costos de compra de donadoras muy caras y que nunca se van a adaptar a condiciones de manejo y de alimentación diferentes a la que están acostumbradas.

8) La transferencia de embriones en receptoras locales y adaptadas, permite que el becerro al nacer tenga cierta inmunidad contra las enfermedades comunes de esa área.

9) Puede transportarse genoma diploide de forma rápida y barata minimizando el riesgo de introducir enfermedades.

10) Permite la conservación de razas y especies.

11) Permite la creación de bancos de embriones.

12) Permite la preservación y reproducción más rápida de razas y especies en peligro de extinción y de aquellas que no lo están (1).

Es recomendable que no pasen más de dos años para aplicar los embriones congelados, ya que una de las razones, es que la genética avanza constantemente y éstos pueden quedar anticuados genéticamente, ó pueden no ser viables al descongelado por problemas en el almacenamiento mientras permanecen congelados.

FALLA DE ORIGEN

8. PRINCIPIOS DE CRIOPRESERVACION.

Los factores básicos de la criopreservación ó congelación de los embriones derivan de las dos primeras leyes de la termodinámica, jugando un papel importante cinco factores: el crioprotector, el ritmo de congelamiento, la temperatura de almacenamiento, el ritmo de descongelamiento y el retiro del crioprotector (14, 62).

Los principios de la criopreservación de los embriones de mamíferos son similares a la criopreservación de otras células vivas, la mayoría de éstos principios son consecuencia de las leyes naturales como son las leyes de la termodinámica. Probablemente el principio más importante de la criopreservación, es la necesidad de remover la mayor parte del agua intracelular antes de que ésta se congele. Si la deshidratación no ocurre, se forman grandes cristales de hielo intracelular, los cuales dañan a las células severamente. Bajo la mayoría de las circunstancias, remover demasiada agua es también detrimental, por lo tanto, se debe de prestar mucha atención a los principios de movimiento del agua a través de la membrana celular, tanto al deshidratar antes del congelado como al rehidratar al descongelado (62).

Sobre las propiedades osmóticas de las células, éstas se encuentran rodeadas de una membrana celular, la cual es permeable a algunas moléculas pero a otras no, adoptando características semipermeables. Por ejemplo, es bastante fácil para el agua atravesar la membrana celular, pero bastante

FALLA DE ORIGEN

difícil que penetre el sodio; la mayor parte del poco sodio que entra a la célula es bombeado hacia afuera por un sistema de bomba de sodio en la membrana celular. El medio de cultivo para embriones, por ejemplo, la solución salina buferada-fosfatada de Dulbecco (PBS) tiene una concentración de moléculas (osmolaridad) de cerca de 300 mosm/Kg, la mayor parte de las cuales son cloruro de sodio, el cual balancea la concentración exacta de moléculas dentro de las células que no pueden salir, por ejemplo las proteínas (62).

Sobre las bases teóricas de las propiedades osmóticas de las células, el agua tiende a diluir las sustancias disueltas en los compartimientos para igualar concentraciones. Si se incrementa la concentración de cloruro de sodio del PBS de tal forma que la osmolaridad sea 400 mosm/Kg, existen más moléculas ó partículas fuera de las células que dentro. Debido a que el agua tiende a diluir las moléculas que están fuera de las células, tiende a salir y la célula se encoge. Esto ocurre debido a que el sodio no puede atravesar la membrana celular. Cualquier molécula que no puede atravesar la membrana celular, causa un efecto similar, por ejemplo, los crioprotectores que no penetran tienen éste efecto. Si se reduce el cloruro de sodio en PBS, de tal forma que la osmolaridad sea de 200 mosm/Kg, la concentración molecular intracelular es más alta, y así el agua tiende a diluir, por lo que se dirige hacia adentro de la célula, causando hinchamiento (62).

Con respecto a la formación de hielo en las soluciones, las células están formadas por agua en un 80 %, los fluidos

corporales tienen más del 90 % de agua al igual que los medios de cultivo. Disueltos en ésta agua se encuentran sales, principalmente cloruro de sodio, pero también cloruro de potasio y otros elementos. Algunas soluciones también contienen concentraciones considerables de proteínas, azúcares y crioprotectores. El punto de congelación de cualquier solución decrece, conforme se aumenta la concentración de moléculas. Otra característica de las soluciones congeladas es que los primeros cristales que se forman son de agua pura, permaneciendo agua sin congelar entre ellos, con una concentración mayor de sustancias disueltas que la original. Ya que el agua se congela, las soluciones que permanecen entre los cristales se tornan más concentradas, es decir hipertónicas favoreciendo la deshidratación paulatina del embrión (62).

Para la siembra y el superenfriado, el punto de congelación de un típico medio de cultivo con cantidades estandares de crioprotectores es cerca de -3°C . Sin embargo si se enfrían tales soluciones a los índices de enfriamiento comunmente usados, entre -3 y $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ocurre el superenfriamiento, lo cual significa que la congelación no ocurre a temperatura más baja que el punto de congelación bajo ciertas condiciones de enfriamiento, el congelado puede ocurrir a más de 10 grados abajo del punto de congelación (62).

Para prevenir el superenfriamiento se debe inducir la formación de cristales de hielo (seeding), lo cual se puede hacer con un pequeño cristal de hielo ó tocando el envase con unas pinzas enfriadas en nitrógeno líquido. Después de la

siembra, el hielo se forma rápidamente en todo el recipiente (62).

Para el enfriado de las células en PBS, se siembra en una solución de PBS que contiene células a -6°C , la mayor parte del agua fuera de la célula se tornará en hielo rápidamente. Tal como se mencionó, las pequeñas cantidades de solución entre los cristales se tornan bastante concentradas, y el punto de congelación desciende. Si el enfriado continúa lento es decir $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ se congela más (crecen los cristales de hielo) y el agua no congelada se torna más concentrada. Las células del embrión, las cuales están en la solución entre los cristales de hielo, responden a esta solución de mayor concentración, perdiendo agua y deshidratándose. Como la solución está aún más fría, se congela más agua, las pequeñas porciones no congeladas se tornan más concentradas y las células pierden más agua.

Si el enfriado continúa lo suficientemente lento, toda el agua dentro de la célula es removida, no quedando nada para que se congele dentro de la célula. Aunque esto previene la formación de hielo intracelular, una deshidratación excesiva puede dañar de otras formas, especialmente si las células son descongeladas rápidamente. Por lo tanto, en la práctica se detiene el proceso antes que la deshidratación sea excesiva, sumergiendo el recipiente dentro del nitrógeno líquido (62).

El principio de la velocidad de enfriamiento indica que el ritmo de descenso de la temperatura debe ser lo suficientemente lento para permitir la salida del agua intracelular y tan

FALLA DE ORIGEN

rápido que evite el exponer a las células durante demasiado tiempo a una solución hipertónica.

La velocidad de paso del agua a través de la membrana celular depende de varios factores:

- Cada tipo de célula tiene una membrana característica propia y algunas son más permeables al agua que otras.

- La relación superficie/volumen: el agua se mueve más rápidamente a través de la membrana en células pequeñas (espermatozoide), que en células más grandes (embriones), ya que las células pequeñas tienen más superficie de membrana celular por unidad de volumen para que pase el agua. Por esta razón es necesario enfriar las células grandes más lentamente que las pequeñas de manera que se deshidraten al mismo grado.

- El tercer factor a considerar es que el agua atraviesa la membrana de acuerdo a la temperatura.

- El factor final a considerar es bastante obvio, el agua atravesará la membrana más rápidamente para diluir soluciones muy concentradas, comparadas con soluciones isotónicas, esto es que la velocidad de movimiento es proporcional a la diferencia de concentración de las moléculas en los dos lados de la membrana celular (62).

8.1 CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores son sustancias que permiten la sobrevivencia de la célula después del congelamiento. Los mecanismos de acción no están totalmente aclarados varían probablemente para diferentes tipos de crioprotectores (62).

Los crioprotectores pueden ser divididos en dos grupos, intracelulares que penetran la membrana celular y extracelulares que obligan a que el agua atraviese la membrana celular para diluir la alta concentración extracelular de las moléculas del crioprotector.

Como ejemplo de crioprotectores intracelulares se tienen el glicerol, el dimetil sulfóxido (DMSO), el etilén glicol y el 1-2 propanodiol, los cuales son moléculas bastante pequeñas. Los crioprotectores extracelulares son más grandes, incluyen grandes moléculas de azúcar, como la sacarosa y la rafinosa, proteínas y lipoproteínas, frecuentemente la vema de huevo, la leche y el suero sanguíneo se usan como crioprotectores extracelulares (62).

La albúmina sérica se ha utilizado como componente tanto de los medios que se utilizan para congelar embriones, como para el almacenamiento de éstos por un tiempo corto; también se conoce que es benéfica para la sobrevivencia del embrión in vitro, sin embargo su valor como crioprotector extracelular no se ha establecido.

El glicerol y el DMSO son crioprotectores que penetran la membrana celular y los más usados para congelar embriones de mamífero (62).

En cuanto al movimiento de penetración de los crioprotectores a través de la membrana celular, hay que tomar en cuenta que la concentración de glicerol o DMSO que se utiliza normalmente varía entre 1 y 2 molar, lo cual significa que hay cerca de cinco veces más moléculas de crioprotector en

solución, que todas las otras moléculas combinadas. Aunque éstas moléculas atraviezan la membrana fácilmente, de tal forma que las concentraciones intra y extracelulares se equilibran, el agua atraviesa aún más fácilmente, lo cual crea problemas. Cuando las células son colocadas dentro de soluciones con crioprotectores, éstas se encogen debido a que el agua deja rápidamente la célula para diluir la alta concentración extracelular de las moléculas del crioprotector, sin embargo con el tiempo, el crioprotector entra en las células de tal forma que la concentración intracelular es la misma que la extracelular. Bajo estas circunstancias el agua regresa a la célula de modo que se equilibra el contenido celular de agua, y la célula regresa al tamaño que tenía antes que se le añadiera el crioprotector. Por lo tanto, la respuesta inicial de la célula al crioprotector es el encogimiento por pérdida de agua, esto es seguido por el retorno al tamaño inicial cuando entra el crioprotector (62).

Frecuentemente, el crioprotector se añade en pasos para disminuir el grado de encogimiento de las células. Sin embargo en éste caso la célula ha de pasar a través de un ciclo de encogimiento y retorno al tamaño normal con cada paso, un proceso que puede ser tan detrimental como un simple paso, aún cuando éste sea más drástico (62).

Un problema mayor que la adición del crioprotector a las células, es removerlo después del descongelado, es decir en forma inversa. Cuando las células llenas del crioprotector son colocadas en medios sin crioprotector, el crioprotector que

FALLA DE ORIGEN

está dentro de la célula sale para diluir el agua y establece un equilibrio de la concentración extracelular; bajo estas circunstancias, frecuentemente las células se hinchan y se rompen lo cual causa daño irreversible. La solución más común a este problema es el remover el crioprotector lentamente, diluyéndolo en una serie de 3 a 10 pasos, (ejemplo: 1.2 M, 1.0 M, 0.8 M, etc), 5 a 10 minutos por cada paso. Así, las células se hinchan ligeramente en cada paso, el hinchamiento inicial y el retorno al tamaño normal ocurre cuando alcanzan concentraciones iguales tanto extracelular como intracelularmente (62).

Una segunda opción para remover el crioprotector de las células es colocarlas dentro de un medio que contenga una alta concentración de una molécula no penetrante como la sacarosa. En esta situación, la tendencia del agua a entrar a la célula para diluir el crioprotector, es balanceado por la tendencia del agua a dejar la célula, debido a la alta concentración extracelular de sacarosa, por lo que la célula no se hincha en cada paso; incluso se encogen dramáticamente, ya que tanto el agua como el crioprotector dejan la célula conforme ocurre el equilibrio. El daño debido al encogimiento es menor que el comparado a la ruptura, por lo que un solo paso para remover el crioprotector puede ser útil para simplificar procesos (62).

Los términos criopreservación y congelación no son sinónimos. La criopreservación significa mantener las células viables a muy bajas temperaturas, mientras que el congelamiento es un cambio de fase, significa cambiar agua (medios) a hielo ó

aceites a grasa, a medida que se baja la temperatura. Algo similar ocurre a los lípidos en la membrana celular, en cualquier caso ocurre más durante la criopreservación que en la congelación, y los crioprotectores probablemente afectan alguno de éstos procesos. Un efecto indiscutible de los crioprotectores, es bajar el punto de congelación. A las concentraciones usadas, éstos causarían únicamente una disminución en el punto de congelación de 2 a 3°C. Sin embargo ésta disminución puede ser multiplicada varias veces en las soluciones salinas, entre los cristales de hielo y en el líquido intracelular, por lo que el congelado especialmente el intracelular ocurre a más bajas temperaturas en presencia de crioprotectores. Esto es benéfico por varias razones, pero principalmente dá a las células mayor tiempo de rehidratarse (62).

Una segunda función de los crioprotectores puede ser interactuar con la membrana celular para disminuir el daño al ocurrir el cambio de una fase fluida a una sólida, ó tal vez, y quizás más importante, cuando las células regresan a fases más fluidas durante el descongelamiento, en donde los crioprotectores hacen menos quebradizas las membranas, previniendo el daño irreversible debido al agrietamiento (62).

El tercer posible mecanismo de acción de los crioprotectores, es que disminuyan los efectos de las altas concentraciones de moléculas en células deshidratadas. La mayoría de las células disueltas en las mezclas de crioprotectores y agua pueden ser menos dañadas, que otras

células que estén en concentraciones mucho más altas en poco líquido y sin crioprotector, como la "Sal Bufferada" (62).

Probablemente los crioprotectores actúan por una variedad de mecanismos, por lo que se requiere mayor investigación para entender la acción de los diversos crioprotectores (62).

La velocidad óptima de descongelado depende del tipo de célula congelada y más importante aún, de la cantidad de agua presente en las células cuando ocurrió la congelación. Si estuvieron presentes grandes cantidades de agua en las células, se formarán cristales intracelularmente. Bajo estas circunstancias es necesario descongelar rápidamente para lograr una buena sobrevivencia, es decir a cientos de grados Celsius por minuto. Si se realiza el descongelado lento en estas células, los pequeños cristales crecen durante el descongelado. Este proceso se conoce como recristalización (62).

Si las células son enfriadas lentamente de tal forma que estén completamente deshidratadas, cuando ocurra la congelación intracelular, no se formarán cristales intracelulares, por lo que no ocurre la recristalización durante el descongelado lento. El descongelado lento de las células a 20 segundos aproximadamente, por lo tanto, permite altas tasas de sobrevivencia. En realidad el descongelado lento causa un extenso daño a tipos de células criopreservadas de esta forma, posiblemente porque el agua entra demasiado rápido a las células causando daño, por lo tanto, la velocidad de deshielo está en dependencia crítica de los procesos de enfriamiento (21).

FALLA DE ORIGEN

9. CAUSAS DE DAÑO EMBRIONARIO EN LA CONGELACION DE EMBRIONES BOVINOS.

Elsden señala que los resultados de los embriones congelados han sido impredecibles, las razones de ésta fluctuación pueden ser divididas en causas conocidas y desconocidas ó, alternativamente, en causas prevenibles y en aquellas con las cuales tenemos que vivir (21).

CAUSAS CONOCIDAS DE DAÑO EMBRIONARIO.

Hay tres causas principales de daño embrionario durante el enfriamiento, la descongelación y el proceso de dilución:

- Deficiente tecnología.
- Mala organización del tiempo y en la preparación del equipo necesario para la secuencia estrictamente cronometrada de los eventos.
- Falla del equipo.

A continuación se discuten los aspectos específicos de cada uno de éstos factores, y se sugieren medios para resolver algunos de éstos problemas (21).

Se obtiene una baja tasa de sobrevivencia embrionaria si la calidad de los embriones es mala, ó si se congelan embriones seleccionados en estadios inapropiados, como mórula temprana ó blastocitos eclosionados. Esto ocurre frecuentemente cuando varias donadoras son superovuladas y sus embriones son colectados el mismo día, en éstos embriones se encuentra un rango variable de calidad y de estadios de desarrollo, y si no

hay receptoras disponibles, entonces se congelan todos los embriones. Puede ser difícil el insistir en solo congelar los embriones de calidad 1 y 2 (21).

Si el intervalo entre la recolección y el congelamiento de los embriones es muy largo, puede resultar en daño a éstos. Los periodos de cultivo de más de seis a ocho horas dañarán algunos embriones en forma irreparable aún después de haber sido cultivados en medio de Ham F-10 gaseado. Los embriones deben ser congelados en el sitio de recolección y trasportarlos al laboratorio antes de congelarlos (21).

Se deben seguir protocolos selectos para asegurar un congelamiento exitoso, por ejemplo para la adición de crioprotectores como el glicerol. Debido a que éste es tóxico para los embriones, es probable que la exposición por más de una hora en glicerol al 10% a 12% a temperatura ambiente, sea dañino para el embrión. Este límite de tiempo puede ser fácilmente excedido si no se realiza el trabajo preparatorio antes de añadir el glicerol, ó si se están procesando muchos embriones a la vez. Se debe de preparar un protocolo de modo que todos los pasos preliminares sean completados antes de exponer los embriones al glicerol (21).

Sobreviven menos embriones, si el "seeding" no se realiza eficientemente. Si se induce la cristalización ("seeding") cuando la temperatura es mayor de -5°C ó 23°F , está se perderá durante la etapa de equilibrio. Esto puede ocurrir por ejemplo, cuando los congeladores registran imprecisamente las temperaturas; entonces los embriones son congelados

FALLA DE ORIGEN

abruptamente a -15°C ó 5°F , conduciendo a extenso daño embrionario ó de la zona pelúcida (ZP). El "seeding" a -7°C ó 19.4°F , es probablemente más seguro ya que no siempre se puede revisar la calibración de los congeladores. Si más del 5 % de las zonas pelúcidas se revientan ó se pierden, los controles de temperatura y los métodos deben ser revisados (21).

Si las pajillas ó las ampollitas son selladas inadecuadamente, entrará nitrógeno durante el enfriamiento y entonces se expande rápidamente por la descongelación, causando un estallamiento y depositando a los embriones en las paredes adyacentes ó en los techos. Este problema puede ser evitado si se pone cuidadosa atención al sellado de las pajillas y de las ampollitas. La incidencia de éstas explosiones aumenta con la práctica de sellar pajillas de 0.25 ml dentro de pajillas de 0.5 ml, lo cual no ofrece ninguna ventaja, ya que el sellado se duplica innecesariamente. La práctica de utilizar pajillas de 0.5 ml es para facilitar su identificación.

Los tapones fabricados de plástico también parecen ser una fuente de problemas si no están cuidadosamente sellados en la pajilla. El sellador más práctico, más barato, más confiable y disponible es el polvo de cloruro de polivinil (PVC) (21).

Los embriones pueden tener una menor tasa de supervivencia cuando se seleccionan macro moléculas. Reportes de experimentos publicados muestran que la albúmina sérica bovina (BSA) al 0.4% tiene mayores porcentajes de viabilidad de embriones comparándolo con el suero al 10% ó 20%. Por lo menos los lotes

de albúmina sérica bovina son más consistentes que las diferentes concentraciones de suero (21).

Es posible que los embriones congelados en medio hechos de agua poco satisfactoria, sean más dañados. No hay reportes que sustenten ésta hipótesis, sin embargo parece lógico que cualquier impureza en el medio y que se concentra en el proceso de enfriamiento, puede volverse tóxica para el embrión. Se recomienda que se ponga más atención a la preparación ó adquisición del medio para la congelación, cultivo ó bipartición de embriones (21).

Pueden resultar daños cuando el aparato congelador está marcando temperaturas en forma imprecisa. Esto es especialmente significativo cuando los embriones son congelados rápidamente a los rangos más bajos de temperaturas de inmersión seguras: cuando ésto ocurre se observa daño excesivo de las zonas pelúcidas a la descongelación. Todas las máquinas congeladoras sin importar al precio deben ser revisadas regularmente para un exacto registro de las temperaturas (21).

Cuando falla la energía de la máquina congeladora ó cuando hay cambios de voltaje, el cese ó interrupción del proceso de enfriamiento conducirá a un daño al embrión. Hay más daño cuando la falla de la máquina congeladora ocurre cuando se está formando el hielo de -7°C a -15°C que después de ésta etapa inicial. El hielo se derrite lentamente cuando hay una falla de la máquina congeladora y el descongelado lento resultante podría dañar las membranas celulares. Una medida de seguridad que siempre vale la pena, es poner atención a la máquina

FALLA DE ORIGEN

mientras congela los embriones. Si hay una descompostura, los embriones deben ser rescatados por medio de descongelamiento rápido (21).

Cuando la dilución de los crioprotectores toma mucho tiempo, por ejemplo, más de una hora; menos embriones sobreviven. A pesar de referencias contrarias en la literatura, se encontró en éste trabajo que una dilución de tres pasos, y 5 minutos por paso, es superior a una dilución de seis pasos y de 10 minutos por paso para remover el glicerol. Existe el informe conocido de los embriones de cinco donadoras que fueron divididos en dos grupos: un grupo de dilución de tres pasos cortos y un grupo de dilución de seis pasos largos. Hubo significativamente más preñeces de los embriones del grupo de dilución corta 6/11 vs 2/9 (21).

La posición inadecuada de los embriones dentro de la pajilla es otra causa potencial de daño al embrión. Después de un descongelamiento cuidadoso, se han observado a los embriones en espacios de aire, en otra columna del medio del originalmente seleccionado, y aún atrapados en el extremo rígido de la pajilla, la cual usualmente se corta al momento de descongelar. Estos problemas se evitan fácilmente poniendo al embrión a la mitad de la pajilla entre dos burbujas de aire y manipulando la pajilla cargada con cuidado extremo (21).

Otros serios problemas al descongelar son la mala rotulación, sin fecha de congelamiento ó formatos llenados en forma incompleta. A menudo ni siquiera se registra la edad del embrión; la sincronía es difícil de realizar cuando la mórula

puede estar presente del día seis al día ocho. Adicionalmente, los blastocelos a menudo se colapsan al momento de la descongelación, dando al embrión la apariencia de mórula (21).

Se recomienda un marcador indeleble de punto fino, es necesario pasar una capa de esmalte para uñas transparente sobre lo escrito cuando se usan congeladores con baño de alcohol (21).

CAUSAS DESCONOCIDAS DE BAJAS TASAS DE SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA DESPUES DE LA CONGELACION.

Muchos practicantes de transferencia de embriones, han observado que los embriones de algunas donadoras sobreviven mejor el congelamiento que los de otras. Cuando los embriones son de mala calidad, éste evento es predecible. No siempre los embriones son de mala calidad, ya que en algunas ocasiones los embriones de calidad 1 y 2 no sobreviven. Además de efectos de la hembra donadora, el semental puede influenciar en la calidad de los embriones. Probablemente una de las técnicas más nuevas para evaluar la viabilidad de los espermatozoides, tales como la fertilización del ovocito, sean de utilidad en los programas de transferencia de embriones en un futuro cercano (21).

FALLA DE ORIGEN

10. PORCENTAJES DE FERTILIDAD.

La transferencia y congelación de embriones es ya una técnica ampliamente difundida y practicada en forma comercial, por lo que debe ser eficiente en cuanto a costos y resultados y uno de los parámetros quizá el más importante para medir dicha eficiencia es el porcentaje de fertilidad.

Existen varios factores que afectan los porcentajes de fertilidad en la transferencia de embriones, siendo los principales: estadio del embrión, calidad morfológica y si se transfiere fresco ó congelado-descongelado (28, 58).

En relación al estadio del embrión, es más importante tomar en cuenta la sincronía estadio del embrión-receptora, que la sincronía donadora-receptora (17, 29, 41, 44, 48, 53, 56, 61, 65).

Hasler reporta porcentajes de fertilidad en embriones frescos de 71.0 %, 77.0 % y 75.0 % para los estadios de mórula, blastocito temprano y blastocito respectivamente (36).

Por otra parte se ha encontrado que la sobrevivencia del embrión transferido depende de la viabilidad de las células de éste, la cual se pretende establecer con base en la evaluación morfológica (23, 29, 36, 37, 44, 65, 67, 78).

Sin embargo las capacidades de concepción de embriones de mala calidad pueden incrementar la eficiencia de la transferencia de embriones. Dependiendo de las facilidades que se tengan, los embriones de mala calidad pueden ser cultivados durante 24 horas para ayudar a su viabilidad. Sin embargo la evaluación post-cultivo de los embriones y los resultados de la

transferencia en índice de fertilidad son iguales a aquellos embriones que no fueron cultivados (10, 29, 43).

Se ha demostrado que el blastocito bovino puede ser refrigerado a 4°C por más de dos días sin descenso significativo de la viabilidad. Esta técnica puede ser usada para almacenar blastocitos en estado de letargo, en casos en los que las receptoras entraron en estro después de la donadora (10, 22, 43).

Donaldson reporta una reducción del 13.3% en los porcentajes de fertilidad por cada disminución en la calidad del embrión (17).

En cuanto a la transferencia de embriones frescos ó congelados-descongelados, se ha observado que con los embriones congelados-descongelados se obtienen menores porcentajes de fertilidad (37, 39, 41, 58).

Screenan y Diskin mencionan que aún el método más eficiente de congelación-descongelación, destruye del 10 al 20% de los embriones empezando las pérdidas en aquellos de baja calidad (58).

En México, García observó que el mayor porcentaje de fertilidad se obtuvo con embriones blastocitos calidad 1 frescos (62.54 %), y en orden decreciente con los blastocitos tempranos calidad 3, frescos (57.143%); blastocitos calidad 2, frescos (52.744%); blastocitos tempranos calidad 1, frescos (50 %) y blastocitos tempranos calidad 1, (47.169%) congelados, es decir los cuatro mejores porcentajes de fertilidad se lograron con blastocitos y blastocitos tempranos. También pudo

FALLA DE ORIGEN

observarse que los embriones frescos obtuvieron mejor porcentaje de fertilidad que los congelados, que existió un decremento en éstos porcentajes conforme lo hubo en las calidades, y que los blastocitos lograron mejores porcentajes de fertilidad que los blastocitos tempranos, y éstos a su vez mejor que las mórulas (28).

Existió significancia estadística entre los porcentajes de fertilidad logrados con los embriones frescos y congelados, entre los blastocitos y las mórulas (28).

La explicación más probable es que en la etapa de blastocito el embrión muestra cierta capacidad para seguir su desarrollo como indican la diferencias estadísticas entre los embriones en estadio de mórula y blastocito (19, 28, 44).

III. MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo de obtención, congelación y transferencia de los embriones se realizó en la explotación "Casa Blanca" ubicada en el municipio de Acatzingo, Puebla. Se localiza entre las coordenadas geográficas paralelo 18°56'48" de latitud Norte y el meridiano 97°49'54" de longitud Oeste.

El municipio se localiza dentro de la zona de los climas templados del Valle de Tepeaca, se identifica el clima C(Wo)(W), clima templado subhúmedo con lluvias en el verano, temperatura media anual de 18°C; precipitación del mes más seco de menos de 40 mm, temperatura del mes más frío entre -3 y 18°C (27).

Las vacas utilizadas como donadoras son de la raza Pardo Suizo Europeo de registro y se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: hembras con características sobresalientes en su raza, con aparato reproductor normal, es decir sin alteraciones congénitas ni adquiridas, que presentaban ciclos estrales regulares y que estaban libres de enfermedades infecto-contagiosas, con mérito genético y un estado físico y nutricional aceptable, las vacas debieron de haber presentado dos ciclos estrales en forma regular después del parto (57, 60).

De la misma manera se seleccionó un lote de vacas receptoras, (aproximadamente 10 por cada donadora), de primero a tercer parto y con pelvis amplias, para evitar distocias, ya que los becerros de pardo suizo nacen pesando aproximadamente de 40 a 50 Kg. éstas receptoras estaban libres de enfermedades

infecto-contagiosas, con un aparato reproductor sano, fertilidad probada, habilidad materna, con ciclos estrales regulares y un estado físico y nutricional aceptable, con un peso aproximado de 500 Kg (50, 51, 60).

Tanto las donadoras como las receptoras recibieron una alimentación, a base de concentrado comercial, pastoreo en praderas, melaza, vitaminas y sales minerales, desde los 45 días antes de iniciarse el experimento hasta 30 días después de la recolección y transferencia de los embriones en las receptoras (51).

INSEMINACION ARTIFICIAL.

La inseminación artificial se realizó a las 12, 24 y 36 horas después de haberse iniciado el calor. En las primeras inseminaciones se utilizarán dos dosis y una sola dosis a las 36 horas (32, 51).

La palpación de cuerpos lúteos en las vacas donadoras se realizó 7 días después de la última inseminación, los embriones obtenidos fueron congelados, descongelados y transferidos a las vacas receptoras con la técnica quirúrgica (7, 32, 60).

RECOLECCION DE EMBRIONES.

La recolección de embriones se realizó de 6.5 a 8 días después de la última inseminación, utilizando la siguiente técnica. La vaca donadora se colocó en una rampa que permitió dar una inclinación anteroposterior para facilitar la

FALLA DE ORIGEN

recuperación por gravedad del fluido de lavado. La recolección se llevó a cabo bajo previa tranquilización y analgesia epidural de la vaca (51, 60).

Después de la antisepsia de la región perineal se inició la recolección de los embriones por medio de un catéter de Foley, el cual consta de dos vías, así como una vejiga inflable que se localiza en la punta del catéter, después de introducir el catéter se fijó en el cuerno del lado del cuerpo lúteo insuflando la vejiga con una jeringa desechable, con el propósito de sellar y evitar la fuga del medio introducido para la obtención de los embriones. La cantidad de medio utilizado fue aproximadamente de 250 a 500 ml por cuerno uterino, el cual se colectó en los Filtros para embriones ENCOM para facilitar su búsqueda, posteriormente se colocaron en cajas de Petri estériles (24, 60, 68).

El medio utilizado fue el Dulbecco Fosfato Bufferado (Laboratorios Gibco) con 1% de suero fetal de becerro recién nacido inactivado (Laboratorio Petes) ó albumina bovina 4 g/l. Una vez concluida la recolección se procedió a la búsqueda de los embriones en el laboratorio, vaciando el contenido del filtro en una caja de Petri cuadrículada con capacidad de 50 ml, en donde se realizó la búsqueda a 12 aumentos utilizando un microscopio estereoscópico. Una vez localizados los embriones se evaluaron a mayor aumento (50 X), de acuerdo a los criterios antes mencionados (12, 68), .

Al finalizar la colección se administraron 50 mg de PGF 2 alfa por vía intramuscular para lisar los cuerpos lúteos

presentes, evitando así una posible gestación en caso de que hubieran quedado embriones en el útero (12, 68).

Todos los embriones fueron examinados individualmente a través un microscopio óptico con un objetivo 200X, para determinar su estadio de desarrollo y su calidad. Se les asigna un código, independientemente del día del estro en el que fueron recolectados. Por ejemplo, los embriones recolectados en los cinco a nueve días después del estro, (siendo el estro el día cero), tendrán diferente desarrollo; mórula el día cinco después del estro, mórula compacta a los seis días, el blastocito temprano a los siete días, el blastocito maduro también a los siete días, el blastocito expandido a los ocho días y el blastocito eclosionado a los nueve días (29, 34, 42, 60, 65, 67).

Con respecto a la madurez del embrión, se seleccionaron mórulas tardías bien compactas y blastocitos iniciales ó maduros. Los embriones fueron lavados en cinco gotas de medio estéril, con una micropipeta de cristal estéril que fue desechada en cada lavado, y colocandose a los embriones en un medio de manejo Dulbecco Fosfato Bufferado (PBS), con 4g/lit de albúmina bovina fracción V y 50 mg/lit de Kanamicina (Gibco) con un Ph de 7.2 a 7.4. Se anotó el tiempo en que fueron colectados. A éste medio de manejo se le agregó glicerol a la concentración de 1.5 M. Fue necesario que los embriones permanecieran en éste medio de congelación de 20 a 40 minutos ya que mayor tiempo puede afectar su fertilidad por toxicidad del glicerol (21).

FALLA DE ORIGEN

Mientras permanecieron en éste medio se rotularon las pajillas, que van a mantener al embrión, de acuerdo al Manual de la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). Se anotaron los datos de la raza, el registro de la donadora, del semental, la fecha de congelación, la edad y la calidad de embrión (Fig 1).

PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA LA CONGELACION DE LOS EMBRIONES

Los embriones fueron cargados en una pajilla de Cassou de 0.25 ml la cual fué introducida a otra de 0.5 ml, para poder anotar todos los datos sin ningún problema. En la parte superior de la pajilla de 0.5 ml se utilizaron colores para saber rápidamente el estadio del embrión: verde para mórulas, verde y rojo para blastocitos iniciales y finalmente rojo para blastocitos maduros, de ésta manera se facilitó el escoger al embrión evitando un sobre manejo de los embriones en el momento del descongelado, seleccionando el embrión según lo requería la receptora. Las pajillas fueron selladas con polvo de Cloruro de Polivinil (PVC) (Figura 1).

Para la congelación de las pajillas se utilizó un aparato manual de congelación, basado en un vaso térmico con nitrógeno líquido y alcohol etílico (etanol) (Figura 2). Con una pinza se fijaron las pajillas en el interior del vaso: la bomba de aire y el termómetro fueron colocados a la altura exacta del embrión. Por ser un factor importante la exactitud del termómetro, se pueden colocar dos al mismo tiempo en caso de que uno falle.

Aunque no en todas la pajillas el contenido del medio quedo exactamente igual, se alineó la parte superior de la columna del medio de congelación para transferencia de embriones que contenía al embrión, para facilitar el proceso de inducción de la cristalización ó seedings.

Para tal efecto, un movimiento rápido a todas las pajillas las acomodó dentro del congelador. Este aparato, la bomba de aire, el termómetro y la pinza, permanecieron verticales dentro del pequeño termo Dewar vacío de doble pared de cristal removible. Este termo posee vacío entre sus dos paredes de cristal de tal manera que la temperatura interior cambia muy lentamente. El termo mencionado tiene en la parte posterior el vacío propio de tal manera que permite al alcohol etílico que esta dentro que el ritmo de descenso de la temperatura fuera de 0.5°C por minuto hasta alcanzar los 6°C bajo cero, donde fueron colocados los embriones. Para uniformar la temperatura del alcohol se sumergió una manguera para introducir burbujeando aire mediante una pequeña bomba de acuario, éste Dewar se sumergió tanto como fue posible dentro del contenedor grande plateado Dewar, el cual contenía el nitrógeno líquido (Fig 2).

El ritmo de descenso de la temperatura se pudo ajustar incrementando ó disminuyendo la cantidad de alcohol etílico en el termo interior, ésta es una de las opciones ya que el incremento disminuye y la disminución acelera. Si el termo interior es sumergido dentro del nitrógeno líquido se incrementa también el rango de congelación. Si se bombea aire a temperatura ambiente desciende el rango de congelación, sin

embargo fue necesario agitar el alcohol etílico desde su parte superior hasta el fondo con la bomba de aire para mantener una temperatura estable en todos los niveles dentro del vaso Dewar. En el congelador se sumergió el termo interior tanto como fue posible dentro del nitrógeno líquido, se colocaron 500 ml de alcohol etílico en el termo interior y se apagó la bomba de aire hasta alcanzar la temperatura de 0°C lo que permitió enfriar a 0.5°C por minuto, posteriormente se accionó de nuevo la bomba de aire y se debió de reducir el rango a 0.3°C por minuto hasta que alcanzó los -34°C . En éste punto se disminuyó el nivel del nitrógeno líquido del contenedor grande de tal manera que el nitrógeno no tocara el termo interior. Esto disminuyó el enfriamiento a aproximadamente $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los -38°C tiempo en que se colocaron los embriones directamente en el tanque de nitrógeno líquido.

Nuevamente se llenó el termo grande con nitrógeno líquido hasta que todo el alcohol etílico del termo pequeño quedó sumergido dentro de éste. Se bombeó un poco de aire a través del nitrógeno líquido con la bomba para mantener la temperatura. El termo interno con el vacío entre ambas paredes previno que la temperatura saltara en rangos muy grandes demasiado rápido. El termo que se utilizó está fabricado por H. S. Martin Co. proporciona un rango constante de $1/3^{\circ}\text{C}$. el termo externo está plateado para conservar la temperatura.

Después de colocar los embriones en la cámara de enfriamiento al llegar a los -6 ó -7°C bajo cero utilizando el rango de congelamiento de 1 ó 2°C por minuto, éste rango es

FALLA DE ORIGEN

más lento, pero no interfiere, solo causa un poco más de consumo. A los -6 ó -7 °C el vaso Dewar de cristal se sacó totalmente del nitrógeno líquido para tratar de mantener una temperatura estable de -6 ó -7 °C bajo cero, se colocaron los embriones y se espero dos minutos para estar seguros que la temperatura del líquido que contiene al embrión esté también a -6 ó -7 °C bajo cero, se llevó acabo un proceso denominado inducción de la cristalización ó "seeding". Para ésto se colocó un objeto de metal ligero, generalmente una pinzas de hemostasis, pinzas para uñas, etc. dentro del nitrógeno líquido hasta que adquieran un enfriamiento considerable. Estando a -6 ó -7 °C se tocó con la pinzas la columna en la parte superior del fluido en la que se encuentra el embrión, lo cual produjo una formación rápida de cristales de hielo. La formación de cristales descendió por la columna, no se tocó ésta columna muy abajo con la pinza procurando que sea en la punta, ya que puede causar daño al embrión si aplica el frío directamente donde él se encuentra. Se trató siempre antes del seeding de mover suavemente las pajillas para que el embrión subiera y se incorporara en el hielo en vez de permanecer en el fondo de la columna dentro de la burbuja de aire donde podría sufrir daños. Esto inicia la deshidratación del embrión por cambio de la presión osmótica que continúa hasta que éste es introducido en el nitrógeno líquido.

Posteriormente al "seeding" la temperatura se detuvo por diez minutos a -6 ó -7 °C bajo cero para luego utilizar un rango de $.5$ °C por minuto hasta -35 °C bajo cero para asegurar la mayor

deshidratación del embrión durante éste proceso, posteriormente el vaso Dewar de cristal se introdujo totalmente al nitrógeno líquido. Cuando el embrión alcanzó la temperatura de -35°C se introduce rápidamente la pajilla en el tanque del nitrógeno líquido (-190°C) ó en cualquier otro recipiente con nitrógeno líquido para conservarlos hasta su descongelación e implantación.

El descongelado se hizo a temperatura ambiente 20 a 25°C , cuando la temperatura ambiente fue mayor a 35°C se descongeló en un termo a una temperatura de 20°C por 30 segundos contando siempre 10 segundos al sacar el embrión del termo antes de meterlo en el termo de descongelar, ésto evitó lesiones para el embrión (58). no existe un método ideal para el descongelado, sin embargo descongelar a 35°C , 30°C ó 25°C fue superior a 20°C por cuarenta segundos, sobre todo para pajillas de 0.25 ml

Seidel (60) sugiera lo siguiente para descongelar pajillas de 0.25 ml: que la pajilla se saque del termo y se mantenga en el aire durante 10 segundos, se transfiera a un termo con agua a 37°C durante 15 a 20 segundos, resultando con éste procedimiento menos zonas pelúcidas rotas y un mejoramiento en la fertilidad.

La remoción del glicerol se hizo en 4 pasos (21).

El procedimiento abarca el uso de tres soluciones A, B y C descritas a continuación:

- Solución A : Contiene PBS modificado + 10 % de suero fetal inactivado ó 0.4 % de albúmina bovina.

- Solución B : Contiene PBS modificado + 10 % de glicerol y 10 % de suero fetal inactivado.

- Solución C : Contiene PBS modificado + 34.2 % (1 M) de sacarosa mas 10% de suero fetal inactivado.

PREPARACION DE SOLUCIONES FINALES.

Las tres soluciones (A, B y C) son mezcladas en las cantidades mencionadas a continuación para hacer los cuatro pasos de descongelación:

PREPARACION DE SOLUCIONES FINALES PARA EL LAVADO DE EMBRIONES PARA DESCONGELACION

PASO	SOLUCION (ml)			SOLUCIONES FINALES
	A	B	C	
1	2.0	12.0	6.0	6 % glicerol más 10.3 % (0.3 M) sacarosa más 10 % de suero.
2	8.0	6.0	6.0	3 % glicerol más 10.3 % (0.3 M) sacarosa más 10 % de suero
3	14.0	-	6.0	10.3 % (0.3 M) sacarosa más 10 % de suero.
4	20.0	-	-	PBS más 10% de suero.

El embrión ya descongelado se colocó en cada paso por 5 a 6 minutos y al final pasó al cuarto paso que ya no contiene glicerol ni sacarosa. ésta solución final se pasó a través de un filtro de 0.45 micrones (Millipore) que se colocó al final de la jeringa, se usaron jeringas sin émbolo de hule, todas de plástico (Air-Tite), se lavó el embrión tres veces antes de cargarlo en la pajilla, también fue necesario que la pajilla

FALLA DE ORIGEN

fuera lavada 2 ó 3 veces en el medio estéril para eliminar cualquier residuo que pudiera ser tóxico para el embrión.

Los resultados de la fertilidad por estadio para embriones congelados-descongelados se analizó con la Prueba de Ji-cuadrada utilizando una tabla de contingencia de 2 x 2 (28).

IV. RESULTADOS.

Se realizaron 387 transferencias de embriones congelados-descongelados con un aparato manual a nivel de campo, de los cuales 249 fueron con embriones en estadio de blastocito y 138 con embriones en estadio de mórula (Anexo 1).

Los porcentajes de fertilidad logrados en este trabajo se encuentran en el Cuadro I, en donde se observa que de los 249 embriones en estadio de blastocito se lograron 126 partos que representan un porcentaje de fertilidad de 53.41% y de los 138 embriones en estadio de mórula se lograron 81 partos que representan un porcentaje de fertilidad de 58.69%.

Es importante enfatizar que de las 387 transferencias de embriones congelados-descongelados que se hicieron a nivel de campo se obtuvieron 214 gestaciones lo que significa una fertilidad total de 55.29%.

Al analizar los resultados obtenidos en éste estudio, por medio de la prueba de Ji-cuadrada, utilizando una tabla de contingencia de 2 x 2, no se obtuvo una diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) al comparar la fertilidad obtenida con los embriones en estadio de blastocito y mórula calidad 1.

V. DISCUSION.

De las 387 transferencias utilizando embriones congelados-descongelados con un aparato manual a nivel de campo, se lograron 214 gestaciones lo que representa un 55.29 % de fertilidad en todo el trabajo, resultados superiores si lo comparamos con otros trabajos hechos en México con técnicas realizadas en laboratorio bajo condiciones mas controladas y con aparatos computarizados para congelar embriones (28).

García encontró diferencias significativas en la fertilidad de embriones congelados de acuerdo al estadio: 40.03% con mórulas, 47.6% con blastocito inicial y 34.43% con blastocitos maduros, todos ellos de calidad 1 (28).

Esto quizá se debe a que los blastocitos corresponden a un desarrollo más esperado al séptimo día después del estro que las mórulas. Además un blastocito es un embrión que ha mostrado cierta capacidad para seguir su desarrollo, mientras que las mórulas por alguna razón van atrasadas (17, 28, 41, 44, 48).

Hasler encontró que aparentemente el estadio del embrión influye en la fertilidad al ser transferidos inmediatamente después de la colección (frescos), la fertilidad ha sido mayor al transferir mórulas (77%) que con blastocitos (75%) (36).

En el presente trabajo aparentemente se encontró algo similar con embriones congelados-descongelados, la fertilidad en mórulas fue de 58.69% y para blastocitos fue de 53.41%, y por lo tanto, no se pudo comprobar que los blastocitos tengan una mayor fertilidad. Una posible explicación a éste hecho es el de que las mórulas no necesariamente van más atrasadas por

FALLA DE ORIGEN

tener algún problema en su desarrollo. Recientemente se ha tratado de establecer la relación entre el desarrollo del embrión y su sexo. Aparentemente las mórulas tienden a generar una mayor proporción de crías hembras que los blastocitos (3), pero esto no implica necesariamente que un estadio de menor desarrollo se relacione con una pobre sobrevivencia (mórula).

Cuando una colección de embriones de una vaca superovulada produce embriones de tres ó más estadios de desarrollo, aproximadamente 70% de los más desarrollados son machos y aproximadamente 70% de los menos desarrollados son hembras (3).

Otra posible explicación es que en éste trabajo se utilizaron solamente embriones que despues del congelamiento seguian siendo calidad 1 (excelentes), y que éstos embriones por haber podido soportar adecuadamente el proceso de congelación-descongelación tengan la misma capacidad para iniciar una gestación.

El hecho de que en ocasiones se hayan obtenido mayores porcentajes de éxito con embriones de menor calidad y con embriones que sufrieron el proceso de congelación-descongelación podría sugerir la existencia de otros factores involucrados, por lo que se requiere desarrollar otras técnicas de evaluación del embrión, además de la morfologica (28, 44).

El porcentaje total de gestación, incluyendo blastocitos y mórulas fue de 55.3%, tomando en cuenta que tanto las colecciones como la congelación y transferencia de los embriones se realizaron a nivel de campo, donde no siempre se cuenta con condiciones óptimas para el manejo de los embriones.

Hasler (35) menciona que el rango de fertilidad que se obtiene al transferir embriones congelados bajo condiciones óptimas es de 55% a 70%, por lo que los resultados de este trabajo se encuentran dentro de dicho rango.

La fertilidad obtenida en este trabajo hace una opción viable la utilización de la técnica de la transferencia de embriones y posibilita su utilización como una herramienta en el mejoramiento genético de los bovinos.

FALLA DE ORIGEN

VI. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en la fertilidad de mórulas y blastocitos congelados y descongelados al utilizar una congeladora manual de embriones a nivel de campo.

La fertilidad total obtenida al transferir embriones congelados fue de 55.3% cifra que se encuentra dentro del rango reportado en la literatura a nivel mundial para éste tipo de técnica.

La obtención de un porcentaje de fertilidad aceptable hace una opción viable la técnica de transferencia de embriones a nivel de campo con un aparato manual posibilita su utilización como una herramienta en el mejoramiento genético del hato nacional, obteniendo becerras y becerros de reemplazo con un alto potencial genético que podrían ayudar a resolver el déficit de leche y carne que sufre México. Así mismo es necesario profundizar en el uso de los aparatos manuales de congelación para obtener mejores porcentajes de fertilidad con el uso de éstos.

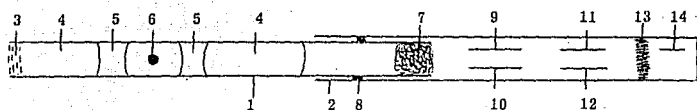


FIGURA 1. Pajilla de 25 ml con el embrión y pajilla de 50 ml para anotar datos.

1.- Pajilla de 25 ml con embrión. 2.-Pajilla de 50 ml con datos. 3.-PVC. 4.-Medio. 5.-aire. 6.-medio con embrión. 7.- Algodón. 8.-Unión de las dos pajillas a base de calor. 9.- Nombre de la vaca y número de registro. 10.-Nombre del toro y número de registro. 11.-Fecha. 12.-Nombre y dirección de la Compañía. 13.-Color de clasificación de embrión. 14.-Número de la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones.

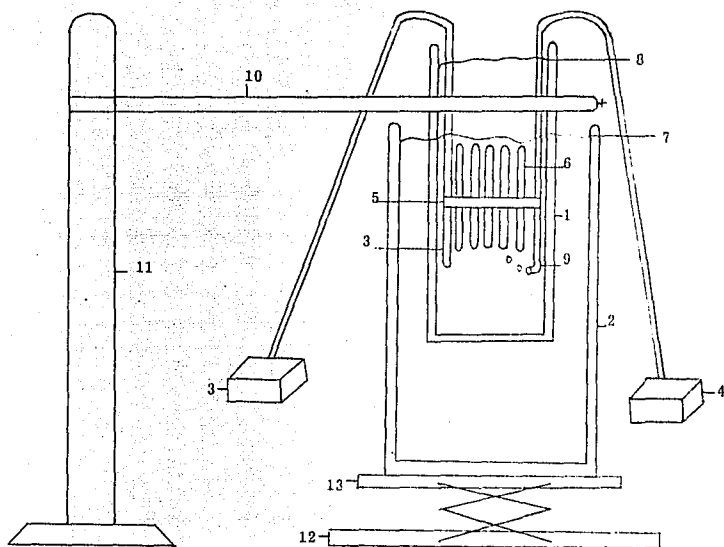


FIGURA 2. Aparato manual para congelación de embriones fabricado por N.S. Martin Co.

1.-Termo Dewar no plateado removible. 2.- Contenedor grande Dewar plateado. 3.- Termómetro. 4.-Bomba de aire. 5.-Pinza para sujetar las pajillas, el termómetro y la cánula de la bomba de aire. 6.- Pajillas con embriones. 7.-Nivel de Nitrógeno líquido. 8.-Nivel de alcohol etílico. 9.- Cánula de la bomba de aire. 10.- Pinza de anillo. 11.-Sostenedor de la pinza de anillo. 12.-Plataforma. 13.-Plataforma móvil.

FALLA DE ORIGEN

CUADRO I

Fertilidad obtenida al transferir mórulas ó blastocitos congelados

	Fertilidad Num Embriones Transferidos	Gestantes	
		Num	%
Morulas	138	81	58.7
Blastocitos	249	133	53.4
Total	387	214	55.3

Anexo 1. Embriones transferidos y gestaciones logradas.

FECHA	BLASTOCITOS		MORULAS	
	ESTADIO	GESTACIONES	ESTADIO	GESTACIONES
21/7/90	7 B	4		
31/8/90	8 B	4	5 M	3
			1 M	1
1/9/90	2 B	2	6 M	4
			2 M	0
13/10/90			8 M	2
			2 M	2
15/12/90			15 M	10
8/ 2/91	3 B	1		
	5 B	4		
9/2/91	5 B	2	11 M	7
14/2/91	4 B	3	4 M	4
7/10/91	5 B	4	7 M	2
5/10/91	7 B	3	4 M	2
	6 B	4		
7/3/92	4 B	4	4 M	4
20/12/91	1 B	1	8 M	4
14/2/92			8 M	4
6/3/92	7 B	5		
2/5/92			5 M	2
14/6/92	4 B	2		
18/7/92	15 B	7		
12/3/93			10 M	5
18/6/93	24 B	11		
2/10/93	11 B	7	11 M	8
3/12/93	16 B	7	10 M	4
11/3/93	3 B	1	1 M	1
3/12/93	20 B	10		
7/1/ 94	12 B	6		
5/2 /94			4 M	2
6/2 /94	9 B	3		
19/2/94	12 B	6		
11/3/94	3 B	1	1 M	1
24/3/94	16 B	8	2 M	1
	7 B	5		
25/3/94	29 B	14	4 M	3
18/6/94	4 B	4	5 M	5

FALLA DE ORIGEN

VII. LITERATURA CITADA.

- 1.- Asprón, P.A.: Técnica de Congelación, Descongelación y Evaluación Embrionaria., Memorias del I Congreso de Transferencia de Embriones en el Ganado Bovino. Fac. Med. Vet. y Zoot. División de Estudios de Posgrado, U.N.A.M. México, D.F.: 115-126 (1985).
- 2.- Austin, C.R. and Short, P.V. : Embryonic and fetal development. Cambridge University Press, 2: 1-4 (1975).
- 3.- Avery, B. : Impact of asynchronous ovulations on the expression of sex-dependent growth rate in bovine preimplantation embryos, J. Reprod. Fert., 87: 627-631 (1989).
- 4.- Bank, H.U. and Maurer, R.R.: Survival of Frozen Rabbit Embryos. Exp. Cell. Res., 89: 188-196 (1974)
- 5.- Bilton, R.J.: Preservation of Embryos of the Large Domestic Species. In: Proc. of 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I., Madrid 1980; 2: 245-253 (1980).

- 6.- Bilton, R.J. and Moore, N.W.: Factors affecting the viability of Frozen stored cattle embryos. Asust. J. Biol. Sci., 32: 101-107 (1979).
- 7.- Betteridge, K.J.: Embryo transfer in farm animals. agriculture Canada. Animal Disease Research Institute. Ottawa, Canada, (1977).
- 8.- Betteridge, K. J. : Techniques and results in cattle superovulation., Embryo transfer in farm animals, K.J. Betteridge., Canada Dé. Agric. Monograph 16: 1-9 (1977).
- 9.- Boland, N.P., Kennedy, L.C. and Gordon, I.: Superovulation in cattle using a single injection of PMSG or HAP. Ir. Vet. J., 74: 307-309 (1984).
- 10.- Bondurant, R.H., Anderson, G.B., Boland, M.P., Cupps, P.T. and Huges, M.A.: Preliminary studies on embryo survive following short-term storage at 4°C. Theriogenology, 17: 223-228 (1982)
- 11.- Bovyssou, B. and Chupin, D.: Two-step Freezing of cattle blastocysts with DMSO or glycerol. Theriogenology, 17: 159-166 (1982).
- 12.- Brand, A. P. and Drost, M. W. : Embryo colección by nonsurgical methods. Embryo transfer in farm animals. K.J. Betteridge, Agriculture Canada. Monograph 16: 16-19 (1977).

- 13.- Chang, M. C.: Normal development of Fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. Nature (London), 159: 602-603 (1947).
- 14.- Chavarria, C. F. : La Crioprotección en el Congelamiento de Embriones de Vacuno. Avance Veterinario, 5: 42-45 (1987)
- 15.- Cole, H.H. : Gonadotropins, Their use W.G. Freeman Co. San Francisco, U.S.A., 40-70 (1964).
- 16.- Donalson, L.E.: Dose of FSH-PAS a source of variation in embryo production from superovulated cows. Theriogenology, 22: 205-212 (1984).
- 17.- Donalson L.E.: Matching of embryo stage and grades with recipient oestrus synchrony in bovine embryo transfer. Vet. Rec. 19: 489-491 1985.
- 18.- Donner, M.L., Oxender, W.E. and Fowell, R.L. : Use of and equine pituitary extract with and without HCG to superovulated cows. Theriogenology. 11: 96 (1977).

FALLA DE ORIGEN

- 19.- Dorn, C.G. and Kraemer, D.C.: Bovine embryo grading 1987, Department of Physiology and Pharmacology, College of Veterinary Medicine Texas A&M University, College Station, Texas, (1987).
- 20.- Elsdén, R.P.: Embryo transfer by surgical methods. Embryo transfer in farm animals. K.J. Betteridge. Agriculture Canada. Monograph 16: 27-28 (1977).
- 21.- Elsdén, R. P.: Freezing Bovine Embryos, causes of embryo damage. Embryo transfer, 2: (1987).
- 22.- Elsdén, R.P., Lewis, S., Cumming, I.A. and Lawson, R.A.S.: Superovulation in the cow following treatment with PMSG and prostaglandin F 2 alpha. J. Reprod. Fertil. 36 (1974).
- 23.- Elsdén, R.P. : Transferring bovine embryos, bovine embryo transfer 1986 Short Course Proceedings. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 50-52, Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, Co., (1986).
- 24.- Elsdén, R. P. and Seidel, G.E. Jr. Embryo transfer procedures in cattle. Anim. Reprod. lab. Colorado State University, Ft. Collins, U.S.A. (1982).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 25.- Elsdén, R. P. and Seidel, G.E. Jr.: Procedures of recovering dissection, freezing and transfer of bovine embryo. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, Co., (1986).
- 26.- Elsdén, R.P., Seidel, J.E.Jr., Takeda, T. and Farrand, G.D.: Field experiments with frozen-thawed bovine embryos htransferred nonsurgically. Theriogenology, 17: 1-9 (1982).
- 27.- García, E.: Modificaciones al sistema de clasificación climatológica de Koeepen. Facultad de Economía, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., (1981).
- 28.- García, R.J.E.: Prcentajes de concepción con embriones frescos y congelados en estadios de mórula, blastocito temprano y blastocito, calidades 1, 2 y 3 transferidos no quirúrgicamente en bovinos lecheros. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. (1982).
- 29.- Gary, M.L., Raymond, W. W.Jr.: Bovine embryo morphologic and evaluation. IXth annual meeting of international embryo transfer society. Colorado State University; 21-32 (1983).

- 30.- Gorlach, A.R., Hahn, R. and Hahn, J.: Studies of superovulation response in bovine embryo transfer by the use of different Gonadotropic hormones combined with anti-gonadotropins. The Blue Book, Hannover, Germany, (1984).
- 31.- Guy, S. Jr., Kramer, D.C., Harms, P.G. and Sehake, L.M.: Superovulation non-surgical embryo collection and rebreeding of post-partum Brangus cows. Theriogenology, 21: 265 (1984).
- 32.- Hafez, E.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 4a Ed. Interamericana, México, D.F., (1984)
- 33.-Halley, S.M., Rhodes, R.C., Mc. Kellar, L.D. and Rahadel, R.D.: Successful superovulation nonsurgical collection and transfer of embryo from Brahman cows. Theriogenology, 12: 97-108 (1979).
- 34.- Hamilton, W.J. and Laing, J.A.: Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. J. Anat. 80: 194-209 (1946).
- 35.- Hasler, J.F.: Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. J. Dairy. Sci. 75: 2857-2879 (1992).

- 36.- Hasler, J.F., Mc Cauller, A.D., Lathrop, W.F. and Foote, R.H.: Effect of donor-embryo-recipient interaction of pregnancy rate in large scale bovine embryo transfer program. Theriogenology, 27: 139-168 (1987).
- 37.- Heyman, Y.: factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. Theriogenology, 23: 63-75 (1985).
- 38.- Jadcowski, S.C., Leibo, S.P. and Mazur, P.: Glycerol permeabilities of Fertilized and unfertilized mouse ova. J. Exp. Zool., 212: 329-341 (1980).
- 39.- Leibo, S.P.: Commercial production of pregnancies from onestep diluted frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 35., 166 (1986).
- 40.- Leibo, S.P., Mazur, P. and Jadcowski, S.C.: Factors Affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exp. Cell. Res., 89: 79-90 (1974).
- 41.- Liehman, P. and Fulka, J.: Pregnancy rate after synchronous and asynchonous transfer of frozen-thawed bovine embryos. Animal Reproduction Science, 11: 181-186 (1986).

- 42.- Linares, T. and King W.A.: Morphological Study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. Theriogenology, 14: 123-129 (1980).
- 43.- Lindner, G.M., Anderson, G.B., Bondurant, R.H. and Cupps, P.T.: Development of bovine embryos after storage at 4°C. Theriogenology, 17 : 96 (1982).
- 44.- Lindner, G.M., and Wright, R. W. Jr.: Bovine embryo morphologic and evaluatio. Theriogenology, 20: 407-416 (1983).
- 45.- Maurer, R.R. and Haseman, J.K.: Freezing Mórula Stage Rabbit embryos. Biology of Reproduction, 14: 256-263. (1976).
- 46.- Mc.Gann, L.E.: Deffering actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. Cryobiology, 15: 382-390. (1978).
- 47.- Miyamoto, H. and Ishibashi, T.: J. Reprod. Fertil., 50: 373-375 (1977).
- 48.- Newcomb, R. and Rowson, L.E.A.: Conception rate after uterine transfer on cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. J. Reprod. Fert., 43: 539-541 (1975).

FALLA DE ORIGEN

- 49.- Niemann, H., Lampeter, W.W., Sacher, B. and Krutt, B.: Comparison of survival rates of day 7 and day 8 bovine embryos after fast freezing and thawing. Theriogenology, 18: 445-452 (1982).
- 50.- Opuesto, F.A.: Recherches experimentales sur la congelation des animaux. J. Anat. Physiol., 3: 1-36 (1866).
- 51.- Posadas, M.E.: Efecto del Gn Rh (Factores liberadores de gonadotropinas) en vacas cebuinas superovuladas. Tesis de maestria. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México., D.F., (1986).
- 52.- Prado, D.A.R., Elsdon, R.P. and Seidel, G.E. Jr.: Effects of GnRH on response to superovulation in cattle. Theriogenology, 21: 254 (1984).
- 53.- Rensen, L.G., Roussel, J.D. and Karihaloo, A.K.: Pregnancy rates relating to plasma progesterona levels in recipient heifers at day of transfer. Theriogenology, 18: 365-372 (1982).
- 54.- Romo, B.B.D.: Clasificación y evaluación de embriones bovinos en la técnica de transplante de embriones. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., (1982).

- 55.- Rowe, F.R.: Nonsurgical transfer of bovine embryos. Proceedings owners Management Workshop. VIIIth Ann. Meet. Int. Embryo Transfer Soc., 57-61, Denver, Colorado (1982).
- 56.- Schneider, H.J. Jr., Castleberry, R.S. and Griffin, J.L.: Commercial aspects of bovine embryo transfer. Theriogenology, 13: 73-85 (1980).
- 57.- Schneider, U. and Mazur, P: Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and it's relation to the survival of Frozen-thawed embryos. Theriogenology, 21: 68-79 (1984).
- 58.- Screenan, J.M. and Diskin M.G.: Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. Theriogenology, 27: 99-113 (1987).
- 59.- Screenan, J.M.: Embryo transfer procedures and its use as a research technique. Vet. Rec. 112: 12-15 (1983).
- 60.- Seidel, G.E., Seidel, S.M. Jr. and Bowen, R.A.: Bovine embryo transfer procedures. Colorado State University, Experiment Station General Series. 975: 12-15, (1978).

- 61.- Seidel, G.E. Jr.: Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: Fertilization and embryonic development in vitro, L. Mastroiani, J.R. Jr. and J.D. Biggers (Eds) p.p. 323-353 (1981).
- 62.- Seidel, G.E. Jr.: Principles of cryopreservation of mammalian embryos Short Course techniques Freezing Mammalian Embryos. Colorado State University, Fort, Collins, Colorado, : 7-13 (1983).
- 63.- Smith, A.V.: Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperature: Nature (London), 170: 374-375 (1952).
- 64.- Solano, R., Armas, R. de, Caral, J. y Hobby, L.: Congelación de embriones bovinos I. efecto de la calidad y estadio de desarrollo durante la congelación y descongelación. Rvta. Cub. Cienc. Vet., 19: 183-192 (1988).
- 65.- Shea, B.F.: Evaluating the bovine embryo. Theriogenology, 15: 31-42 (1981).
- 66.- Suarez, A.M, Guerra, D., Pérez, C.T. y De Los Reyes, B.A.: Manual de Genética Animal II y III. Ediciones E.N.S.P.E.S., Ciudad de la Habana, (1982).

- 67.- Takeda, T., Hallowell, S.V., Mc Cauley, A.D. and Hasler, J.F.: Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transfer surgically and non-surgically. Theriogenology, 25: 204 (1981).
- 68.- Testart, J.P. and Godard-Siour, C.J.: Transvaginal recovery of uterine eggs in the cow. Theriogenology, 4: 163-168 (1981).
- 69.- Trounson, A.D., Shea, B.F., Ollis, G.W. and Jacobson, M.E.: Frozen storage and transfer of bovine Embryos. J. Anim. Sci., 47: 677-681 (1978).
- 70.- Whittingham, D.G.: Survival of Mouse embryos After freezing and Thawing. Nature (London), 233: 125-126 (1971).
- 71.- Whittingham, D.G.: The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. J. Reprod. Fertil., 37: 159-162 (1974).
- 72.- Whittingham, D.G. and Adams, C.E.: Low temperature preservation of rabbit embryos. J. Reprod. fertil., 47: 269-274 (1976).

FALLA DE ORIGEN

- 73.- Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science (Wash., D.C.), 178: 411-414 (1972).
- 74.- Wilmut, I.: The effect of cooling rate warming rate cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during and thawing. Life Sci., 11: 1071-1079 (1972).
- 75.- Wilmut, I., and Rowson, L.E.A.: Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec., 92: 686-690 (1973).
- 76.- Willadsed, S.M., Polen, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M.: Deep Freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fertil., 46: 151-154 (1976).
- 77.- Willadsed, S.M., Polen, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M.: Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. Cryobiology, 11: 560 (1974).
- 78.- Wrist, M.J.: Non-surgical embryo transfer in cattle. Theriogenology, 15:43-56 (1980).