



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN PRODUCCIÓN
DE OVINOS Y CAPRINOS**

CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES OVINOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**ESPECIALIZACIÓN EN PRODUCCIÓN DE OVINOS Y
CAPRINOS**

PRESENTA:
NORHAN CORTÉS FERNÁNDEZ DE ARCIPRESTE

ASESOR:
M. en C. ARTURO ÁNGEL TREJO GONZÁLEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARIA DE POSGRADO
SECRETARIA TÉCNICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES- CUAUTITLÁN
Presente

Por este medio nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo titulado "Criopreservación de embriones ovinos" que presenta la alumna **NORHAN CORTÉS FERNÁNDEZ DE ARCIPRESTE**, con número de cuenta **9329462-3** para obtener el grado de **Especialización en Producción de Ovinos y Caprinos**. Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el Examen General de Conocimientos correspondiente, Otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. 14 de febrero de 2008

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: MPA. ROSALBA SOTO GONZÁLEZ

VOCAL : DRA. ANGÉLICA MARÍA TERRAZAS GARCÍA

SECRETARIO DR. ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

1ER SUPLENTE M. C. ARTURO TREJO GONZÁLEZ

2DO. SUPLENTE DRA. MARÍA ROSARIO JIMÉNEZ BADILLO

DEDICATORIAS

En estos momentos de mi vida, deseo dedicar este pequeño pero satisfactorio triunfo a mis hijas Itsiteri y Sesasi, esperando ser una inspiración para ellas, y deseando que sepan que siempre hay que tratar de ir más allá, siempre hay algo nuevo que ver o saber. Las amo muchísimo y soy feliz de tenerlas conmigo.

A mi marido Juan, que siempre me ha estado conmigo y me ha ayudado a lograr mis metas, te amo y deseo de todo corazón seguir juntos amándonos como hasta ahora y hacer de nuestras hijas las mejores personitas. Además de darme sus sabios consejos, nuevamente TE AMO.

Alguien que no puede faltar jamás mi madre preciosa Esperanza, además de mi querido hermano Mauricio y mi amada sobrina Irania, que también siempre me han apoyado en todo y me han dado ánimos para continuar con mis estudios.

A una persona importante en mi vida, mi amiga Adriana, gracias por escuchar y estar cuando te necesito. Te quiero mucho.

A las personas que no están ya conmigo, pero sé que estarían felices de ver este logro, espero estén bien y con Dios.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Guillermo Tomás Oviedo Fernández, por haberme dado la oportunidad de ingresar a esta especialidad. Gracias.

A mis sinodales MPA. Rosalba Soto González, Dra. Angélica María Terrazas García, Dr. Alfredo Medrano Hernández y Dra. Ma. Rosario Jiménez Badillo por su paciencia y sus comentarios adecuados.

A mi asesor MC. Arturo Trejo González, gracias por su apoyo y paciencia, además le agradezco que hay sido tan buena persona y asesor.

Igualmente gracias a los profesores de la especialidad por haberme dado a mí y ha todos mis compañeros un poco de su sabiduría en tan poco tiempo.

ÍNDICE

1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
3.- Desarrollo embrionario temprano	4
4.- Antecedentes de la transferencia de embriones	6
5.- Congelación	9
6.- Crioprotectores	10
7.- Clasificación de embriones	13
8.- Protocolos de superovulación y congelación	14
9.- Breve descripción de las principales hormonas utilizadas en la superovulación	17
9.1.- GnRH	17
9.2.- FSH	17
9.3.- Progesterona	18
9.4.- Prostaglandina F2 α	19
10.- Objetivo	20
11.- Material y Métodos	21
11.1.- Recolección de embriones	23
11.2.- Búsqueda de embriones y clasificación	27
11.3.- Congelación de embriones y ovocitos	30
11.4.- Descongelado de los embriones y ovocitos	33
12.- Resultados	35
13.- Discusión	41
14.- Conclusiones	43
15.- Bibliografía	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cronología del desarrollo del embrión en la oveja	4
Cuadro 2. Comparación de la concentración y tipo de crioprotector utilizado por diferentes autores	11
Cuadro 3. Ovejas seleccionadas para el experimento	21
Cuadro 4. Cantidad de anestesia aplicada a cada una de las ovejas	23
Cuadro 5. Evaluación del grado de desarrollo embrionario	27
Cuadro 6. Evaluación de la calidad morfológica	28
Cuadro 7. Respuesta al tratamiento de superovulación por la observación de cuerpos hemorrágicos	35
Cuadro 8. Resistencia a la congelación	37
Cuadro 9. Total de embriones y ovocitos recuperados	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo embrionario del ovino	5
Figura 2. Relación de las diferentes hormonas que controlan el ciclo estral	19
Figura 3. Observación de cuerpos lúteos	23
Figura 4. Ovarios con 17 cuerpos lúteos de la oveja 398	24
Figura 5. Colocación de la sonda Foley	25
Figura 6. Introducción del medio de recolección de embriones	25
Figura 7. Búsqueda de embriones en el microscopio	28
Figura 8. Colocación de embriones en el medio de transferencia	29
Figura 9. Pajilla con embrión	30
Figura 10. Congeladora automática	31
Figura 11. Descenso de temperatura	32
Figura 12. Equipo para descongelación de embriones	33
Figura 13. Oveja 395, embrión y zona pelúcida	36
Figura 14. Oveja 398, ovocitos	36
Figura 15. Embrión fuera de la zona pelúcida	38
Figura 16. Acercamiento del embrión	39
Figura 17. Ovocito descongelado	39
Figura 18. Ovocito descongelado	40
Figura 19. Embrión con deformidades y gran cantidad de espermatozoides pegados a la zona pelúcida	40

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Secuencia del tratamiento	22
Diagrama 2. Secuencia del descongelado de embriones y ovocitos	34

1. RESUMEN

El presente trabajo se realizó utilizando 4 ovejas para probar un protocolo de superovulación y criopreservación de embriones, los embriones obtenidos por medio de una cirugía, se congelaron y poco tiempo después se descongelaron para observar su viabilidad. El tratamiento de superovulación se inició el día 1 con la inserción de esponjas vaginales con 40mg de Acetato de fluorogestona (FGA) (Chronogest, Intervet); el día 7 se aplicó una inyección intramuscular de GnRH 0.35 mg; del día 9 al día 12 se aplicó FSH (Folltropin, Vetrhepharm) con una dosis total de 188mg de manera decreciente 2 veces al día; el día 11 del tratamiento, se aplicó PGF2 α 50 mg (Cloprostenol, Cheminova); el día 12 se retiraron las esponjas y finalmente los días 13 y 14 se colocaron las hembras con los machos.

Se recolectaron 2 embriones y 5 ovocitos, los cuales se congelaron colocando cada estructura en una pajilla de 0.5 ml, al principio se dejó una burbuja, se introdujo medio de transferencia (Holding) (Emcare, ICP Bio, Distribuido por Agtech), se colocó el embrión u ovocito con 1.5 M de etilenglicol (Biolife, Distribuido por Agtech), y se dejó otra burbuja, se introdujo a 2 cm medio de transferencia Holding y al final se selló con alcohol polivinílico. Las pajillas se introdujeron en una congeladora automática hasta que llegaron a los -35°C. Al descongelar los embriones y ovocitos, se perdió un ovocito, al observarlos en el microscopio, los ovocitos se clasificaron en un grado 4, los embriones en un grado 3 y 2.

Los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que se pensó en recuperar solo embriones y como se realizó el tratamiento de superovulación, se esperaba encontrar gran cantidad de éstos. Diversos factores pudieron haber afectado el experimento, uno de ellos es la diferencia del horario en la aplicación de la FSH, además de la dosis, la cual pareció ser insuficiente.

2. INTRODUCCIÓN

El trasplante de embriones es un método de reproducción artificial basado en la transferencia de embriones producidos por una hembra donante (madre con genética superior) a hembras receptoras (madres portadoras) que lo gestan hasta su nacimiento. La producción de embriones ha sido propuesta como una metodología tendiente a la preservación de especies en peligro de extinción, que brinda la posibilidad de disponer de bancos genéticos para su conservación y un reaseguro sanitario para evitar la transmisión de enfermedades. En el caso de la producción, se utiliza para aumentar su eficiencia y construir rebaños con el mínimo riesgo de ser portadores de enfermedades y permitir una amplia difusión mundial de animales con alto mérito genético; además de esto la facilidad de poder transportar los embriones congelados fácilmente de un lado a otro (Gibbons y col., 1991; Hafez, 2002; Borowczyk y col, 2003).

La eficacia de la transferencia embrionaria depende de mantener la viabilidad de los embriones desde el momento de la recolección a la transferencia. La congelación ha sido un método eficaz para la conservación de los embriones, se ha demostrado que la sobrevivencia posterior al descongelamiento depende de la calidad inicial del embrión, la etapa de desarrollo, la especie, el tiempo transcurrido desde la recolección al descongelamiento, el tipo de crioprotector y el protocolo de enfriamiento (Hafez, 2002).

El grado de éxito que se puede lograr en un programa de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) depende, principalmente de la respuesta obtenida en el tratamiento superovulatorio y de la sobrevivencia del embrión después de su transferencia. La superovulación se puede afectar por diversos factores, dentro de los cuales se encuentran el tipo y la dosis de gonadotropina empleada. Por otro lado se comenta que al utilizar FSH que contiene o está contaminada con LH se disminuye la respuesta superovulatoria, sin embargo en otros trabajos se menciona que se aumenta la respuesta si la dosis de FSH contiene una cantidad conocida de LH; estas diferencias pueden estar influenciadas por la raza de los animales (Aké-López y col., 2003).

Otros factores que afectan la efectividad en un programa MOET son el estado de desarrollo del embrión, la calidad del mismo, el número de cuerpos lúteos, la edad y parición de las hembras receptoras, ya que se ha reportado que suelen ser significantes. El estado del embrión se ha estudiado mucho en bovinos y ovejas, algunos estudios indican que hay una mayor sobrevivencia de embriones en etapa de blastocisto que el que se encuentra en mórula (Bari y col. 2003).

La progesterona juega un rol muy importante en el desarrollo temprano del embrión, la implantación y la gestación. Las concentraciones de progesterona en el plasma de las hembras receptoras, está relacionada al número de ovulaciones o cuerpos lúteos en las ovejas; se ha reportado que la sobrevivencia de embriones se incrementa con una concentración alta de progesterona en el plasma en bovinos y el número de cuerpos lúteos en cabras (Bari, y col., 2003).

Durante la preparación de los programas de transferencia de embriones, aparecen a menudo condiciones desfavorables tanto para la donante como para la receptora que si no se toman en cuenta puede llevar al fracaso. Existen errores que pueden ser evitados como cambios innecesarios de patios o establos, cambios en la ración o tipo de dieta, fallos en la aplicación de las inyecciones, confusión de medicamentos, etc. Además de esto pueden presentarse patologías clínicas repentinas como mastitis, cojeras, celos prematuros, que conducen fácilmente al fracaso (Görlach, 1997).

Algunos embriones se pueden transferir y otros permanecer congelados hasta analizar registros productivos y evaluar el mérito genético. La mayor inversión en el proceso de transferencia de embriones son las receptoras, desde el punto de vista práctico, la ventaja más importante es que se necesitan menos receptoras, no es necesario sincronizar el celo de muchos animales, significando grandes costos en hormonas, sino que se pueden ir transfiriendo los embriones a medida que se obtienen receptoras en un apropiado estado del ciclo estral; significando disminución de costos y uso más eficiente del capital. Otra gran ventaja práctica, implícita en el momento de la transferencia de embriones es la de poder controlar la ocurrencia del parto (Boggio, 1997).

3. DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO

Una de las peculiaridades de la reproducción sexual en los animales es que su complejo pluricelular se origina a partir de una sola célula: el óvulo fecundado.

Es necesario por consiguiente, que la célula única se transforme en un cuerpo pluricelular. Esta transformación tiene lugar al principio mismo del desarrollo y se logra mediante varias divisiones celulares que suceden rápidamente (Ruíz, 1988).

Esta serie de divisiones celulares es el proceso de la segmentación y el cual el óvulo fecundado unicelular se transforma por medio de divisiones mitóticas consecutivas, en un complejo pluricelular llamado blástula. No hay crecimiento o aumento de volumen entre el cigoto y la blástula. La segmentación del cigoto o huevo consiste en la división vertical a lo largo del eje principal, las células hijas son llamadas blastómeros, la división mitótica continúa. Una vez que el embrión ha formado 9 a 16 blastómeros, y en algunos casos más, se denomina mórula, debido a su gran parecido con una mora. La forma general del embrión no cambia, si se exceptúa la formación de una cavidad interna: el blastocele. El crecimiento durante este proceso puede considerarse negativo, puesto que la masa celular disminuye hasta en un 40% en la oveja, sin embargo los núcleos si aumentan de tamaño, y en los cromosomas se conserva la cantidad apropiada de ácido nucléico (ver cuadro 1 y figura 1)(Hafez, 2002, Ruíz, 1988).

Cuadro 1.- Cronología del desarrollo del embrión en la oveja

Días	Diferentes etapas antes y después de la ovulación
0	Aparición de celos, pico de la LH, empadre o inseminación.
1	Ovulación, fecundación
2	Estadio 2 blastómeros (1ra. División)
3	Estadio 8 blastómeros
4	16 células, mórula.
5	48 células (16-76 céls: mórula)
6	100 células (44-150 céls): blastocisto joven
7	200 céls, blastocisto.

FAO, 1995

Desarrollo Embrionario del Ovino

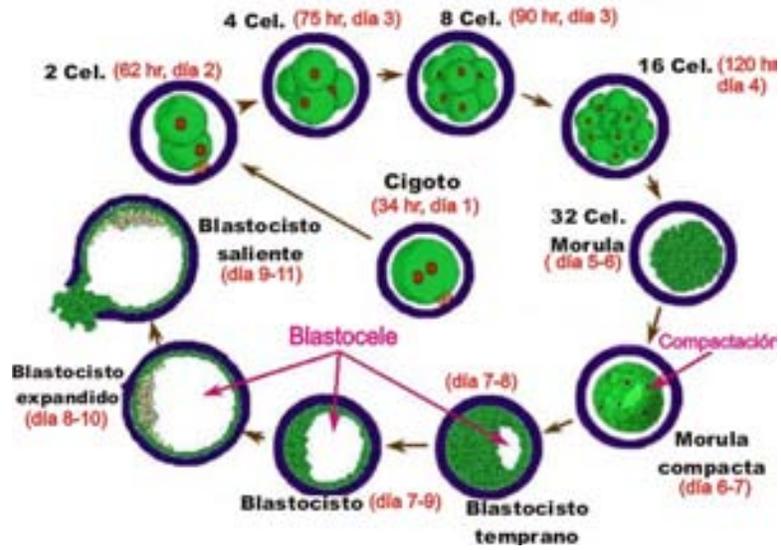


Figura 1.- Desarrollo embrionario del ovino
Figura modificada de www.wisc.edu

4. ANTECEDENTES DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La historia de la transferencia de embriones se remonta a 1891 cuando Heape realizó con éxito la primera transferencia embrionaria en conejos (Hafez, 2002).

Las primeras transferencias de embriones en los caprinos y ovinos datan de los años 50, a partir de los años sesenta se han realizado, numerosos trabajos sobre todo en Australia y Nueva Zelanda. Estos trabajos han contribuido a precisar mejor las condiciones y posibilidades de la producción y transferencia de embriones en las especies, y a aumentar su eficacia. Sin embargo, la práctica de este método esta poco desarrollada en los pequeños rumiantes, no así en los bovinos. El caso de la cabra Angora en Australia y Nueva Zelanda constituye una excepción, ya que el trasplante de embriones se práctica allí rutinariamente desde ya hace tiempo (FAO, 1995).

En 1972 se publicaron los primeros resultados del nacimiento de mamíferos provenientes de embriones conservados a -196°C (Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972). Willadsen y col. (1976) lograron los primeros corderos a partir de embriones congelados. Desde entonces han nacido miles de animales de unas 22 especies mamíferas; la congelación de embriones permite preservarlos indefinidamente, esto se ha integrado a la agricultura, biología y medicina, se están convirtiendo en procedimientos de rutina en la ganadería y es ampliamente aplicada en la industria de la transferencia de embriones (Boggio, 1997).

Esta técnica ha sido empleada durante los últimos años en Australia y Nueva Zelanda, con el objetivo de incorporar material genético de cabras de Angora, reduciendo los riesgos sanitarios. En Francia actualmente se emplea en el programa de mejoramiento genético de razas ovinas lecheras Lacaune, productora de leche para el queso Roquefort, y recientemente se ha comenzado con la exportación de embriones congelados de cabras lecheras de las razas Alpina y Saanen (Gibbons y col, 1995).

Con esta tecnología se permite el comercio internacional de material genético de gran valor y además se disminuye el costo de la transportación, ya que no hay necesidad de transportar al animal en pie, se disminuye el riesgo de trasferir enfermedades infecciosas. A pesar de las medidas sanitarias existentes, el riesgo de introducir enfermedades nuevas al rebaño provenientes de animales vivos es muy alto, la técnica de transferencia de embriones disminuye este riesgo, puesto que los embriones presentan una barrera natural contra virus y bacterias, por ejemplo, se ha demostrado la posibilidad de obtener embriones provenientes de

madres infectadas con el virus de Lengua Azul; por lo tanto es posible recuperar material genético de un hato infectado (Gibbons y col, 1995;Boggio, 1997).

Según Gibbons y col (1995), existen varias consideraciones y principios sobre la transferencia de embriones que deben tomarse en cuenta:

- ♣ La elección de las hembras donantes se realizará tomando en cuenta su valor genético, y en base a los criterios de mejoramiento de las aptitudes productivas de cada raza.
- ♣ Las condiciones generales de un buen manejo reproductivo, sanitario y nutricional, son básicos tanto para donadoras, como para receptoras.
- ♣ Las hembras deben haber tenido por lo menos 1 cría y se debe considerar un mínimo de 2 meses en ovinos a 5 meses en caprinos postparto antes de comenzar los tratamientos hormonales. Ya que al acortar los tiempos puede disminuir los índices de fertilidad.
- ♣ En caso de utilizar corderas, éstas deben tener por lo menos el 60% del peso adulto de la raza y haber presentado estros anteriormente.
- ♣ Se recomienda no utilizar primas como receptoras, lo ideal son hembras adultas para tener una buena lactación.
- ♣ No descuidar los aspectos sanitarios.
- ♣ Utilizar machos con una alta genética, previamente probada por medio de su progenie o bien sus padres hasta abuelos.

En la transferencia de embriones deben tenerse en cuenta diversas consideraciones en cuanto a toda la técnica, estas son:

- ♣ Fisiología hormonal y sincronización del estro.
- ♣ Estimulación ovárica para la ovulación múltiple.
- ♣ Factores que intervienen en la respuesta de la ovulación múltiple.
- ♣ Inducción de la ovulación en las hembras receptoras y sincronización del estro en la hembra donante y la receptora.

- ♣ Fecundación en la hembra donante.
- ♣ Colecta de embriones.
- ♣ Búsqueda de embriones.
- ♣ Clasificación de embriones.
- ♣ Cultivo de embriones.
- ♣ Conservación de embriones.

5. CONGELACIÓN

La criopreservación tiene como finalidad mantener al embrión en un estado de animación suspendida, deteniendo todos los procesos biológicos, incluyendo la actividad enzimática intercelular, la respiración celular, su metabolismo, además del crecimiento y multiplicación de la célula, logrando ser reanimado después de un corto o largo período de tiempo, sin perder su capacidad de desarrollarse y nacer vivo (Rall, 1992; Gordon, 1994; Tanaka et al., 1997; Cabodevila y Teruel, 2001). Tal interrupción de la embriogénesis, constituye un poderoso método de control de la reproducción animal (Rall, 1992). Para su logro, es necesario el uso de bajas temperaturas, teniendo presente los fenómenos físicos y químicos involucrados en el congelamiento de la materia viva (Palasz y Mapletoft, 1996).

Para que un líquido cristalice se requiere la presencia de “núcleos” sobre los cuales la fase líquida pueda condensarse. En el agua pura, grupos de moléculas unidas por un puente de hidrógeno actúan como núcleos de cristalización (nucleación homogénea), aunque otras sustancias (proteínas, minerales, etc.) también pueden actuar como núcleos (nucleación heterogénea). De este modo, la formación de cristales se lleva a cabo mediante un proceso de “desarrollo” de núcleos seguido por uno de agregación de moléculas de agua desde la fase líquida a la sólida en una zona de interfase, denominado “crecimiento”. El proceso de congelación es que a medida que una solución acuosa se enfría por debajo de 0°C disminuye el movimiento molecular, sobre enfriándose hasta alcanzar una masa crítica de núcleos, momento en el cual se libera el calor latente de cambio de estado. Uno de los efectos de la cristalización en las soluciones acuosas es remover agua de la solución, ya que los cristales que se forman están compuestos por agua pura, por lo cual la solución remanente, que permanece sobre enfriada, se concentra. De este modo, esta nueva solución permanece líquida hasta que se alcanza, mediante una mayor extracción de calor, el nuevo punto de equilibrio de congelamiento. Este proceso se repite hasta que a una determinada temperatura, denominada eutéctica o “punto eutéctico”, la fase líquida remanente y los solutos solidifican (Mucci y col. 2006).

Durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intra o extracelular que pueden disminuir la sobrevivencia post-criopreservación. Para minimizar estos problemas se ha recurrido a sustancias llamadas crioprotectores, así como tasas de descenso térmico controladas mediante la utilización de máquinas congeladoras programables de alto costo (Boggio, 1997; García-García, 2005; Mucci y col. 2006).

6. CRIOPROTECTORES

En términos simples los crioprotectores pueden definirse como sustancias que protegen contra los efectos dañinos de las temperaturas de congelación. Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular:

a) Los agentes penetrantes son sustancias de bajo peso molecular y por ello permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta (Boiso, 2001).

Los más utilizados son:

- ♣ 1,2-Propanodiol (PROH)
- ♣ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- ♣ Etilenglicol (EG)
- ♣ Glicerol

Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua.

b) Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (Boiso, 2001).

Los más utilizados son:

- ♣ Sacarosa, Glucosa, Dextrosa
- ♣ Polivinil-pirrolidona (PVP)
- ♣ Dextrano
- ♣ Polietilen-glicol (PEG)

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su citotoxicidad, la adición se realiza a 4°C, 37°C o a temperatura ambiente (Boiso, 2001).

Mucci y col. (2006) muestran un cuadro donde se comparan diferentes autores, el origen de los embriones y la concentración y tipo de crioprotector utilizado, así como la sobrevivencia (%) de los embriones (ver cuadro 2):

Cuadro 2.- Comparación de la concentración y tipo de crioprotector utilizado por diferentes autores

Autor	Origen	Concentración y tipo de crioprotector	Sobrevivencia (%)
Trounson y col., 1978	In vivo	Dimetilsulfóxido (DMSO) 1,5 M	25-50
Lehn-Jensen y col., 1981	In vivo	Glicerol (G) 1.4 M	60-67
Leibo, 1984	In vivo	G , 1.5M	36-67
Voelkel y Hu, 1992	In vivo	Etilenglicol (EG) 1.5 M	70
Hochi y col., 1996	In vitro	EG, 1.5 M	96.3
Pugh y col., 1998	In vitro	EG, 1.5 M	60.9
Sommerfield y Niemann, 1999	In vitro	EG, 1.8 M	30
Khurana y Niemann, 2000	In vitro	G 10%	36
	In vitro	G 10%	80
Kaidi y col., 2001	In vitro	G 11.36 + sacarosa 0.25 M	70-75
Abe y col., 2002	In vitro	EG 1.8 M	50-74.7

Tomado de Mucci y col, 2006

En 1913 Maksimov describió los efectos benéficos del glicerol y crioprotectores no permeables, incluyendo a la sucrosa. En 1937, Bernstein y Petropavlovsky realizaron una serie de investigaciones donde demostraron los efectos positivos del 1 M glicerol en espermatozoides congelados de ratón y cuyo. Desde entonces se ha comenzado a utilizar para la criopreservación de embriones, técnica más utilizada en bovinos que en ovejas (Isachenko y col. 2003).

La introducción del etilenglicol como crioprotector permitió desarrollar la técnica de transferencia directa de embriones congelados/descongelados (procedimiento similar a la inseminación artificial); Este crioprotector tiene más ventajas que otros, como una alta velocidad de penetración y baja toxicidad, que se han observado en embriones ovinos (Boggio, 1997; García-García, 2005; Mucci y col. 2006).

Boggio, (1997) menciona que el etilenglicol por su rápida penetración no necesita extraerse en la descongelación, por lo tanto permite la transferencia del embrión directamente a la receptora.

Además de esto, el crioprotector que se utiliza es de suma importancia, por ejemplo, se sabe que el etilenglicol es un buen criopreservador; en la investigación realizada por Cocero y col. (2002), al compararlo con el glicerol, se demostró que es más eficaz el etilenglicol, sobre todo en el estado de mórula. Tanto en mórula como en blastocisto con el etilenglicol mostraron una alta uniformidad en los blastómeros. Ellos mencionan que sus resultados muestran que el etilenglicol protege las estructuras citoplasmáticas y la membrana de la criopreservación, mejor que el glicerol. Mencionan que al utilizar dimetilsulfóxido, el cuál es otro crioprotector que se ha utilizado, frecuentemente al congelar, las membranas de las células embrionarias se rompen.

Se menciona que los blastocistos producidos in vitro y cultivados en una etapa temprana del embrión (2 – 4 células) en ovejas tienen mayor posibilidad de sobrevivencia que los obtenidos in vivo (García y col., 2005).

Estudios realizados con un tratamiento de superovulación en hembras con su ciclo normal, se demostró que los embriones producidos in vitro son más sensibles a la criopreservación, además de disminuir significativamente el porcentaje de gestación que los embriones transferidos y producidos de manera natural in vivo. A pesar de esto la transferencia de embriones frescos, ya sea producidos in vivo o in vitro resultaron en porcentajes de gestaciones similares, lo cual sugiere que en condiciones in vitro el desarrollo temprano del embrión es similar al desarrollo in vivo (Borowczyk y col, 2003).

En humanos los primeros nacimientos obtenidos tras la criopreservación de ovocitos se obtuvieron tras la aplicación de un protocolo de congelación similar al aplicado para la criopreservación de ovocitos de ratón, basado en la adición de dimetilsulfóxido (DMSO 1.5 M). Las tasas de supervivencia (74%) y de fecundación (75%) tras la congelación-descongelación fueron elevadas. Sin embargo, y pese a aplicar los mismos o semejantes protocolos de criopreservación, los resultados obtenidos posteriormente fueron inferiores. La principal causa que determina la baja supervivencia de los ovocitos es la formación intracelular de cristales de hielo que rompen las membranas celulares provocando la lisis celular. El DMSO actúa como crioprotector permeable, pero la deshidratación previa del ovocito sólo se logra por la adición de sacarosa u otros azúcares no permeables, al medio de congelación, dada su naturaleza de crioprotector no permeable (Molina y col. 2004).

7. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES

De acuerdo a la clasificación de la International Embryo Transfer Society (IETS), los embriones se clasifican de la siguiente manera (tomado de Gibbons, 1995):

Grado 1.- EXCELENTE, embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme. El desarrollo embrionario corresponde al día de la recolección. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles y la zona pelúcida está intacta.

Grado 2.- BUENO, hay algunas imperfecciones triviales, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de vesículas. Su forma puede ser ligeramente irregular.

Grado 3.- REGULAR, el embrión posee defectos definidos: detritus celulares, forma irregular, color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida. Pocas células degeneradas, vesículas y presencia de blastómeros desprendidos.

Grado 4.- MALO, el embrión posee severos defectos: los correspondientes al grado 3 más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida (el embrión puede estar parcialmente fuera de la misma), forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros. Incluye a los estados hasta 8 células y la degeneración. Esta categoría de embriones no es transferible.

8. PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN Y CONGELACIÓN

Existen diversos protocolos tanto de superovulación como de congelación de los embriones, algunos de ellos tienen menos dosis de FSH, implementan el CIDR, aunado a la esponja, no utilizan Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH); en cuanto a la congelación se utiliza en la mayoría de los trabajos como crioprotector el etilenglicol por ser considerado el mejor producto por sus cualidades antes mencionadas.

Según Massip y col (1987) y Niemann (1991), los pasos generales durante el proceso de congelación-descongelación de embriones son:

- ♣ Exposición de los embriones a las soluciones de congelación.
- ♣ Envasado de los embriones
- ♣ Enfriamiento inicial
- ♣ Inducción de la cristalización o “seeding”
- ♣ Descenso térmico lento y controlado
- ♣ Descenso térmico rápido
- ♣ Almacenamiento en N₂ líquido
- ♣ Descongelación
- ♣ Extracción de los crioprotectores

García-García (2005) en su experimento utilizó etilenglicol, el protocolo que siguió fue el siguiente:

Primero los embriones fueron estabilizados en 0.75 M etilenglicol a 32°C por 10 minutos y después se cambiaron a 1.5 M etilenglicol por 10 minutos en las mismas condiciones antes descritas; después se colocaron en la pajillas y el programa de congelamiento se realizó primero de 1°C a -7°C, se realizó la inducción de la cristalización y se fue disminuyendo la temperatura hasta llegar a -35°C, se introdujeron en nitrógeno líquido y se almacenaron de un mes a un año.

Berlinguer y col. (2004) realizaron un experimento, donde su objetivo era comparar la capacidad de desarrollo de los ovocitos de ovejas, con dos diferentes protocolos de estimulación ovárica. Dividió los animales en tres grupos, el grupo A (control) no se le dio ningún tratamiento hormonal, al grupo B se le dio un tratamiento dosis constante de FSH y al grupo C se le dio la misma dosis, pero de manera decreciente. Los grupos B y C se sincronizaron mediante la inserción de esponjas intravaginales impregnadas con acetato de fluorogestrona (Chronogest, Intervet). La dosis total de FSH fue de 96 UI, en el grupo B se administró de manera constante 24 UI por cuatro días, al grupo C la dosis fue decreciente siendo 38.8, 28.8, 19.2 y 9.6 UI.

En los resultados que obtuvieron se observó una diferencia significativa entre el total de los folículos encontrados en el grupo control y los otros dos; teniendo mayor cantidad de éstos las ovejas a las cuales se les administró la FSH de manera decreciente (grupo C), aunque entre estos grupos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa.

En otro estudio de Aké-López y col. (2003), se seleccionaron hembras de la raza Pelibuey en base a los siguientes criterios: que no se encontraran amamantando, que tuvieran entre dos y seis partos, que no tuviesen problemas reproductivos en su último parto y que tuvieran una condición corporal entre 3 y 4 de acuerdo con la escala de 1 a 5. Se sincronizaron los estros con implantes (Norgestomet), los cuales permanecieron por 9 días y al momento de retirarlos se administró por vía intramuscular 150 UI de eCG, el tratamiento superovulatorio en un grupo (grupo FSH y LH) se trataron con 500 UI de FSH y 500 UI de LH y otro grupo (grupo FSH) se trató con 25 mg de FSH, las inyecciones para ambos grupos se aplicaron cada 12 horas en la mañana y en la tarde durante 4 días, en dosis decrecientes. Al tercer día se aplicó 7.5 mg de prostaglandina F2 α en la mañana y en la tarde.

Los resultados que arrojó este estudio fue que las donadoras de ambos grupos respondieron satisfactoriamente al tratamiento hormonal; a pesar de que no se observa diferencias significativas entre los tratamientos, se encontró que la respuesta de las ovejas tratadas con FSH fue ligeramente mayor en cuanto al número de óvulos, embriones y embriones transferibles comparada con los promedios de las ovejas superovuladas con FSH-LH.

El tratamiento más aceptado para producir la ovulación múltiple, según Gibbons (1995), es la aplicación de 16 mg totales de FSH. La administración se realiza en dosis decrecientes (5, 4, 3, 2, 2 mg) cada 12 horas, a partir del día 12 de colocada la esponja intravaginal con progestágeno. Las esponjas se retiran a la cuarta aplicación de FHS.

La dosis de FSH se expresan en miligramos Amour, que es una unidad de actividad de un test biológico, equivalente a 10 a 14 μ g de hormona FSH pura. Las dosis recomendables para las cabras y las ovejas varían entre los 16 a 20 μ g Amour. El incremento de esta dosis no induce un incremento de la respuesta ovulatoria según Peña (2006).

Según Brebion y col. 1992, el protocolo para la superovulación debe de ser el siguiente:

Día 0 colocación de esponja con 40mg de FGA (acetato de fluorogestona).

En el día 12 se administra 5 mg de FSH, mañana y tarde.

Día 13 se administra 3 mg de FHS, mañana y tarde.

Día 14, se administra 2 mg de FSH, mañana y tarde y se retira la esponja.

Jabbour y col, 1991 menciona el siguiente protocolo:

Día 0 colocación de la esponja con 60 mg de MAP (acetato de medroxiprogesterona).

Día 10 administración de 3 mg de FSH y 400 UI de PMSG, mañana y tarde.

Día 11 administración de 2 mg de FSH, mañana y tarde.

Día 12 administración de 1 mg de FHS, mañana y tarde, retiro de la esponja.

Según Bearden (1982) otra técnica para la superovulación aplicar de 600 a 1,000 UI de eCG subcutáneamente el día 12 o 13 del ciclo estral han sido eficaces en las ovejas. El nivel de LH liberada por la glándula pituitaria de la oveja, aparentemente es adecuado para causar la ovulación de los folículos inducidos sin la inyección adicional de LH.

9. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIFERENTES HORMONAS UTILIZADAS EN LA SUPEROVULACIÓN

9.1 GnRH

Es un decapeptido, es sintetizada y almacenada en el hipotálamo basal medio. Esta hormona proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En respuesta a las señales neurales, se liberan pulsos de GnRH hacia el sistema portal hipofisiario para la liberación de LH y FSH de la hipófisis anterior (ver figura 2).

La secreción de esta neurohormona varía de acuerdo a agentes externos e internos:

- ♣ Externos.- fotoperiodo, olores, estrés.
- ♣ Internos.- retrocontroles endocrinos por los estrógenos o la progesterona (Gibbons, 1991; FAO, 1995; Hafez, 2002).

Para reducir la variabilidad en la respuesta ovulatoria, así como para lograr un mayor número de corderos nacidos por oveja donante (incremento en un 50%) se recomendó la utilización de antagonistas de la GnRH durante el tratamiento pregestacional, para provocar una inhibición temporal del crecimiento folicular, hasta que se provoca la ovulación múltiple mediante gonadotropina (Gibbons, 1991; FAO, 1995; Hafez, 2002).

Bloqueo antigonadotropo por un análogo de la GnRH.- Este método se basa en el principio de que el bloqueo fuerte pero temporal de la función gonadotropa retrasa el crecimiento de los folículos pequeños (1-2 mm de diámetro) y determina en consecuencia el aumento de su número, siendo una importante condición para el éxito de la superovulación (FAO, 1995).

9.2 FSH

Es una glucoproteína, secretada en la adenohipófisis, la hormona foliculoestimulante promueve el crecimiento y la maduración del folículo ovárico o folículo de Graaf. Induce en el folículo la aparición de receptores de la LH y mantiene la secreción de estrógenos. La FSH no causa la secreción de estrógeno del ovario por sí sola, sino que necesita la presencia de LH para estimular la producción de estrógeno. La secreción de FSH, más o menos es continua, presenta dos picos en su intensidad:

- ♣ Simultáneamente a la descarga preovulatoria de LH.

- ♣ Dos o tres días más tarde (segundo pico de intensidad más débil)

La superovulación con FSH se presenta con 8 dosis idénticas en 4 días consecutivos. También se han desarrollado protocolos con dosis decrecientes, en el día 4° tras el comienzo del tratamiento, independientemente del tipo de FSH utilizado, dos dosis de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (una por la mañana y otra por la tarde) para la inducción del celo (FAO, 1995; Görlach, 1999; Hafez, 2002).

9.3 Progesterona

Es secretada por las células lúteas del cuerpo amarillo, la placenta y la glándula suprarrenal. La progesterona es transportada en la sangre por una globulina de enlace; la secreción de progesterona es estimulada por LH, principalmente y realiza las siguientes funciones (FAO, 1995, Hafez, 2002):

- ♣ Prepara al endometrio para la implantación y mantenimiento de la preñez, lo cual aumenta la actividad de las glándulas secretorias en el endometrio e inhibe la movilidad del miometrio.
- ♣ Actúa sinérgicamente con los estrógenos para inducir el comportamiento estral.
- ♣ Desarrolla el tejido secretor (alvéolos) de la glándula mamaria.
- ♣ En concentraciones altas inhibe el estro y la oleada ovulatoria de LH.
- ♣ Inhibe la movilidad uterina.

Se dispone de progestágenos sintéticos para sincronizar el estro de los rumiantes, se utiliza para inhibir la secreción de LH (FAO, 1995, Hafez, 2002).

9.4 Prostaglandina F₂α

Las prostaglandinas se aislaron primero de líquidos de glándulas sexuales accesorias y se denominaron prostaglandinas por su asociación con la próstata. Casi todos los tejidos corporales las secretan, pero en especial por el endometrio se secreta la PgF₂α. El ácido araquidónico, que es un ácido graso esencial, es el precursor de las prostaglandinas relacionadas más estrechamente con la reproducción, principalmente PgF₂α y PgE₂. El incremento de la secreción de PgF₂α generada por el útero provoca la luteólisis, la caída de la progesterona y la aparición de un nuevo período de celo. Se utilizan muchos análogos de PgF₂α en Medicina Veterinaria, particularmente para el control de la duración del ciclo sexual y poder programar así la aparición del celo (FAO, 1995, Hafez, 2002).

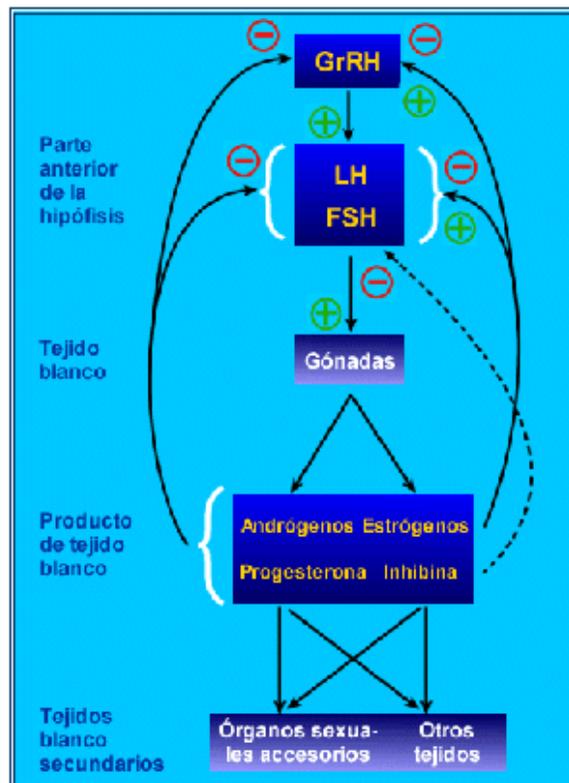


Figura 2.- Relación de las diferentes hormonas que controlan el ciclo estral

Tomado de www.biopsicologia.net

10. OBJETIVO

Evaluar una modificación al protocolo de superovulación utilizado por Peña, 2006 y un protocolo de congelación para embriones ovinos.

11. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el mes de Junio, en las instalaciones de la Cátedra de Reproducción y Genética en Ovinos y Caprinos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán del Centro de Enseñanza Agropecuaria.

El experimento se inició con la selección de las ovejas de la raza Columbia, mediante la nota de condición corporal (NCC), se seleccionaron cuatro ovejas con identificación 85, 395, 398 y 894, como donadoras de embriones de más de 4 años de edad, a las cuales se les revisó cada semana la nota de condición física con el siguiente peso y NCC, al inicio del trabajo:

Cuadro 3.- Ovejas seleccionadas para el experimento

Identificación	Peso (Kg)	NCC
85	71	3.5
395	50	2.5
398	61	3
894	49	2.5

Un mes antes del tratamiento hormonal se estuvieron revisando las ovejas seleccionadas observando que no disminuyeran su NCC.

No se separaron de las demás ovejas y tuvieron el mismo tipo de alimento basado en alfalfa fresca y paja de avena.

Las ovejas se indujeron a la sincronización por medio de esponjas vaginales con 45 mg de FGA (Chronogest, Intervet); en el día 7 se aplicó 0.35 mg por oveja de GnRH (Conceptal, INTERVET); en el día 9 se inició el tratamiento superovulatorio con 188 mg de FSH (Folltropin, Vetrepharm) en dosis decreciente, dos veces al día por 4 días. En el día 12 se aplicó una dosis única de PGF2 α (50 mg Cloprostenol, Cheminova).

Las esponjas se retiraron en el día 12 y a las 24 horas de retiradas éstas, se llevaron a las instalaciones dos machos del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la FES-Cuautitlán, se colocaron dos hembras con cada macho en corrales separados (ver diagrama1).

Los machos se quedaron con las hembras por dos días, se realizó una citología vaginal para confirmar que las hembras fueron montadas y se observó al microscopio la presencia de espermatozoides.

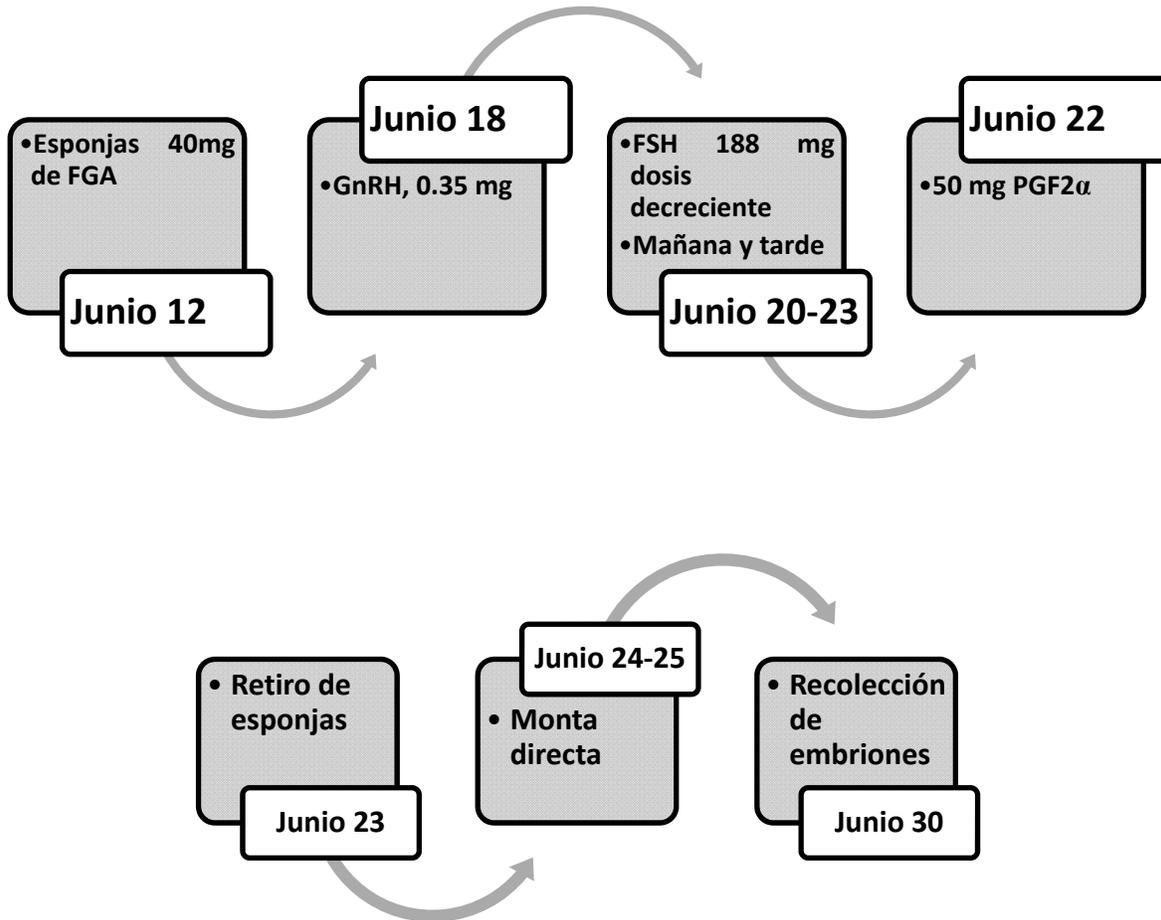


Diagrama 1.- Secuencia del tratamiento

Todas las aplicaciones de los fármacos fueron de manera intramuscular, excepto las esponjas.

11.1 RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Previó ayuno de 24 horas, se lavó con agua corriente la lana de la parte ventral de las ovejas, se rasuró y se prosiguió con la anestesia, mediante la administración intravenosa de Xilacina-Ketamina, ésta se utilizó a razón dosis-respuesta; como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 4.- Cantidad de anestesia aplicada a cada una de las ovejas

Identificación de la oveja	Xilacina(mg)	Ketamina(mg)
85	0.2	0.1
395	0.4	0.1
398	0.5	0.2
894	0.5	0.2

Una vez en la mesa de cirugía, se procedió a lavar con agua y jabón la zona rasurada, desde el pubis hasta el esternón, se desinfectó con Cloruro de Benzalconio y se procedió a realizar una laparoscopia con el propósito de evaluar la respuesta al tratamiento superovulatorio antes de comenzar el tratamiento quirúrgico (ver figura 3).



Figura 3.- Observación de cuerpos lúteos

Después de la observación de cuerpos lúteos, se realizó una incisión de 8-10 cm. en la piel sobre la línea blanca delante de la ubre, se exteriorizaron los cuernos uterinos y ovarios, en ese momento se contaron y registraron los cuerpos lúteos (ver figura 4). Después de esto se realizó una pequeña incisión en la base del cuerno uterino para colocar una sonda Foley de dos vías calibre 12 (ver figura 5). En la unión útero-tubárica, se puncionó para colocar una punta sobrepuesta en una jeringa de 50cc que contenía 50 ml de medio de recolección (Advantage-Biolife) (ver figura 6).

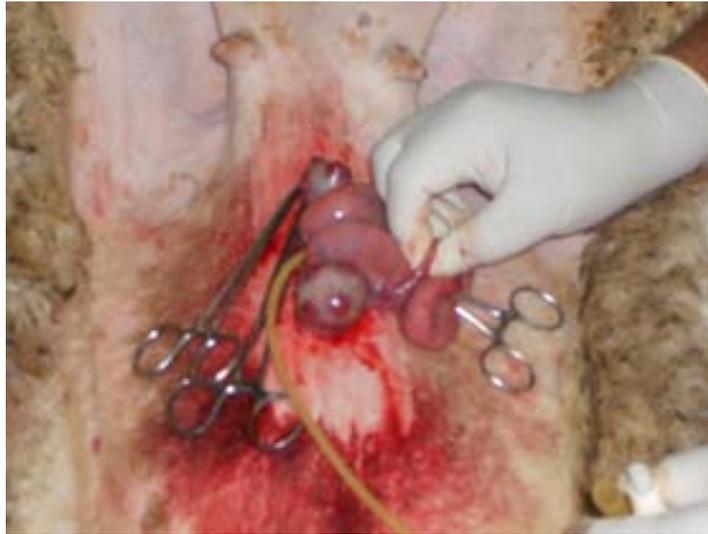


Figura 4.- Ovarios con 17 cuerpos lúteos de la oveja 398



Figura 5.- Colocación de la sonda Foley



Figura 6.- Introducción del medio de recolección de embriones

El medio introducido fue recogido por la sonda Foley y recibido en un tubo para centrifuga de 50 ml de capacidad. Una vez que se obtuvo el medio de recolección de ambos cuernos, se realizó la búsqueda y clasificación embrionaria y de los ovocitos obtenidos.

Después de la recolección, se procedió a introducir los cuernos uterinos a su lugar, y se cerró la incisión por planos con sutura absorbible (Catgut 2-0). Se aplicó por vía intramuscular 5 ml de L-eticina (Oxitetraciclina, Lab. Torne), el tratamiento se continuó por 3 días más. Aunado a esto se le aplicó 75 mcg de Cloprostenol para lisar los cuerpos lúteos de la oveja identificada con el número 398.

11.2 BÚSQUEDA DE EMBRIONES Y CLASIFICACIÓN

La búsqueda de los embriones en el medio de recolección se llevó a cabo con la ayuda de un especialista. Se vació 10 ml del medio en cajas de petri y se observó al microscopio estereoscópico con un aumento de 15X para la búsqueda de los embriones y la evaluación embrionaria a 60X (ver figura 7).

Para la evaluación embrionaria se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

La apropiada clasificación y evaluación de los embriones determina la valoración de su viabilidad y predicción para determinar que embriones deberán transferirse y a que receptoras. La transferencia de ovocitos o embriones degenerados podrían provocar una drástica disminución en los porcentajes de preñez y un aumento en los costos de la técnica.

Estas consideraciones han sido tomadas en cuenta por varios especialistas (Linder y Wright 1983; Dorn y Kraemer 1987; Kuzan 1990) entre otros, llegando prácticamente a unificar los criterios de evaluación destacando dos aspectos principales que son el estadio de desarrollo y la morfología del embrión.

Ambas valoraciones son subjetivas pero basadas en características definidas. Para facilitar el manejo de información surgida de la evaluación, la International Embryo Transfer Society (IETS) ha propuesto una guía para la clasificación de los embriones (Peña, 2006).

Cuadro 5.- Evaluación del grado de desarrollo embrionario

NÚMERO	ESTADIO
1	No fertilizado
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula compacta
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto maduro
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto en eclosión
9	Blastocisto eclosionado

Cuadro 6.- Evaluación de la calidad morfológica

NÚMERO	CALIDAD
1	Excelentes
2	Buenos
3	Regulares
4	Malos y degenerados

Los embriones y ovocitos encontrados, se colocaron en una gota por separado con el medio de transferencia (Emcare, Embryo holding solution).

Para facilitar el manejo al colocar los embriones y los ovocitos en las pajillas, se colocó una gota de medio de transferencia (Holding) y una gota de Etilenglicol (ver figura 8).



Figura 7.- Búsqueda de embriones en el microscopio

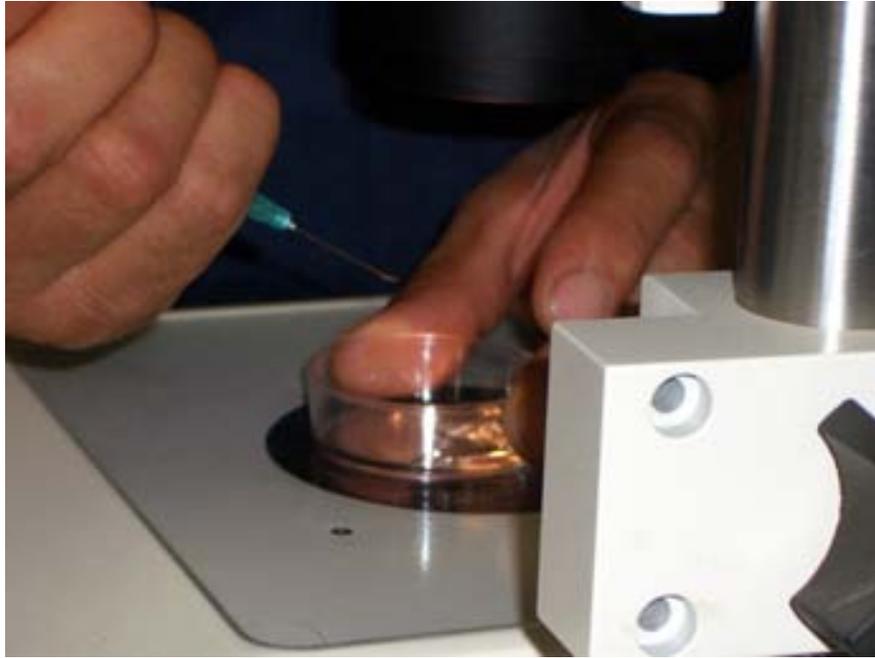


Figura 8.- Colocación de embriones en el medio de transferencia

11.3 CONGELACIÓN DE EMBRIONES Y OVOCITOS

Para la congelación de los embriones y ovocitos se utilizaron pajillas de 0.5 ml y se realizó de la siguiente manera:

- ♣ Se dejó una burbuja de aproximadamente medio centímetro.
- ♣ Se introdujo 2 cm de medio de transferencia.
- ♣ Se dejó otra burbuja.
- ♣ Se coloca en aproximadamente 2.5 cm el embrión u ovocito con 1.5M Etilenglicol (Biolife).
- ♣ Burbuja
- ♣ 2 cm de medio de transferencia.
- ♣ Se sella con alcohol polivinílico.

La siguiente figura esquematiza como quedaron las pajillas con los embriones y ovocitos.

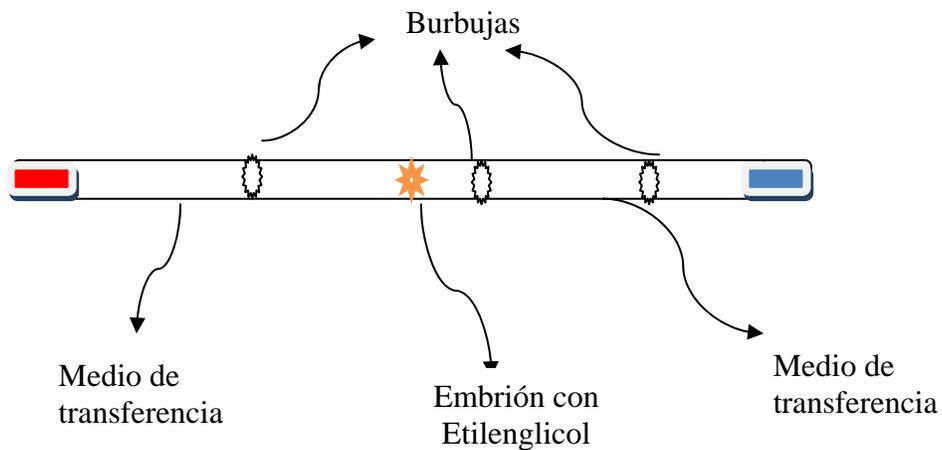


Figura 9.- Pajilla con embrión

Para la congelación de embriones se utilizó una congeladora automática, que registra la temperatura del medio de congelación, de acuerdo al siguiente protocolo:

- ♣ A la congeladora se le introdujo Alcohol isopropílico en el compartimiento donde se colocaron las pajillas, para regular los aumentos de temperatura que el nitrógeno líquido le transfiere y se colocó entonces sobre el termo con nitrógeno líquido (ver figura 10).
- ♣ En el termo también se introduce una barra de cobre atada a un cordón.
- ♣ Una vez alcanzado el equilibrio se inicia la congelación. Se colocan las pajillas con los embriones en la congeladora (-6°C) durante 1 min (estabilización) y se induce la cristalización “seeding” con la barra de cobre.
- ♣ Hecha la cristalización, la congeladora comienza a bajar progresivamente la temperatura hasta llegar a la temperatura deseada de -35°C (ver figura 11).



Figura 10.- Congeladora automática

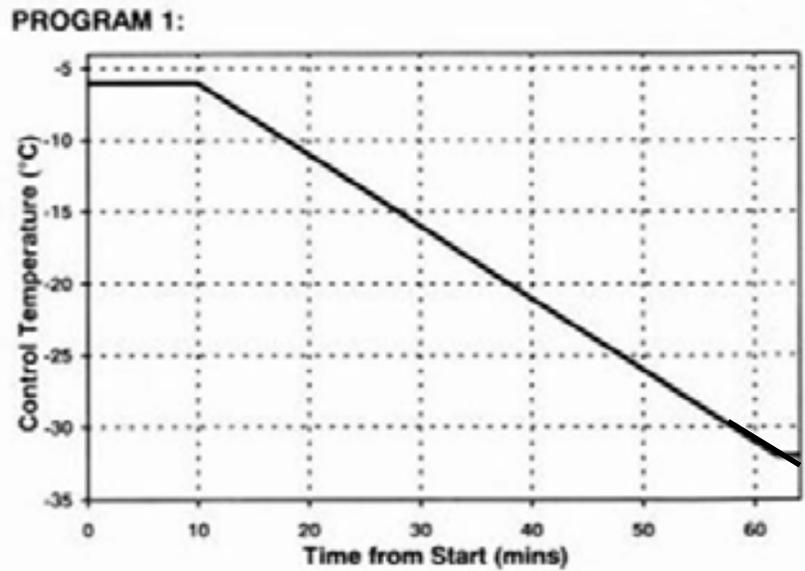


Figura 11.- Descenso de temperatura
Temperatura inicial -6°C , temperatura final -35°C

Una vez que se llega a esta temperatura, se sacan las pajillas de la congeladora y se colocan en el termo para su almacenamiento.

11.4 DESCONGELADO DE EMBRIONES

Se utilizó un microscopio estereoscópico y uno de contraste de fases, una platina y un baño maría a 37°C ambos (ver figura 12). Cajas de petri que se colocaron en la platina con varias gotas de una solución de Complete Flush (Bioniche) 3ml y Etilenglicol (Bioniche) 2ml.

Las pajillas se sacaron del termo y se colocaron en el baño maría por 2 minutos, una vez hecho esto se colocó cada embrión en una gota para la observación al microscopio estereoscópico, una vez hecho esto, se cambiaron de solución y se realizó la observación en el microscopio de contraste de fases (ver diagrama 2).



Figura 12.- Equipo para la descongelación de embriones

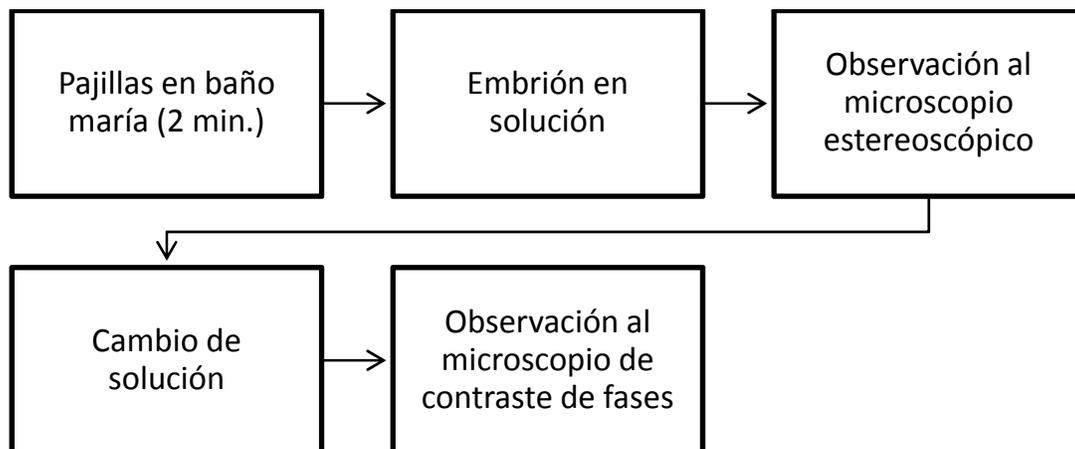


Diagrama 2.- Descongelación de los embriones y ovocitos ovinos.

12. RESULTADOS

A las 24 horas después de retiradas las esponjas, se introdujeron los machos, dos con cada hembra. Los animales solamente se observaban por las mañanas y en ningún momento se vio que los machos montaran a las hembras, por lo cual se tomó citología vaginal para la observación de espermatozoides; en la oveja con identificación 398 no se observaron espermatozoides.

Todas las ovejas al ser evaluadas por medio de laparoscopia mostraron una respuesta al tratamiento, al realizar la cirugía se observó que la respuesta fue pobre en 3 de las ovejas, y solo una mostró una respuesta sólida al tratamiento de superovulación, observándose 17 cuerpos hemorrágicos. En el cuadro 7 se muestran los resultados:

Cuadro 7.- Respuesta al tratamiento de superovulación por la observación de cuerpos hemorrágicos

Oveja ¹	Peso (Kg)	R.O.D ²	R.O.I. ³	R. T. ⁴	REC. ⁵	Calidad
85	71	2	0	2	0	
395	50	1	2	3	1	3
398	61	10	7	17	6	4
894	49	1	0	1	0	

1. Identificación de la oveja, 2.Respuesta ovario derecho, 3. Respuesta ovario izquierdo, 4.Respuesta total, 5. Recuperados

Se procedió a descongelar las pajillas una semana después de la congelación de los embriones y ovocitos, al descongelar las pajillas, una se rompió y perdimos un ovocito.

En la oveja con identificación 395, se observó 1 embrión y una zona pelúcida (ver figura 13).

La oveja con identificación 398 se recuperaron 6 ovocitos y se observó una zona pelúcida (ver figura 14).



Figura 13.- Oveja 395, embrión y zona pelúcida

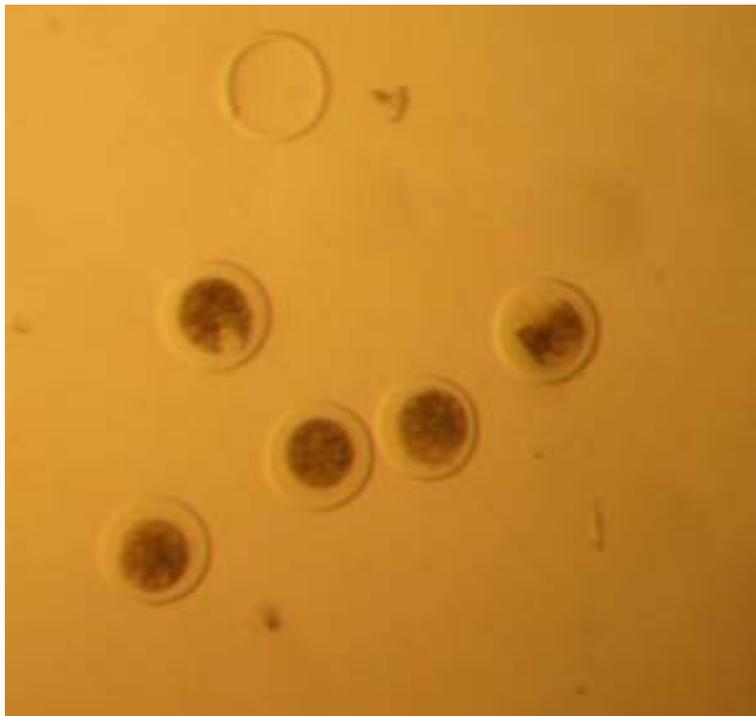


Figura 14.- Oveja 398, ovocitos

Con un aumento en el microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40X, se observó la resistencia a la congelación del embrión y ovocitos, observando que no hubiese rompimiento de la membrana; además de esto pudimos observar dos embriones y cuatro ovocitos, ya que al momento de la recolección de embriones solo observamos un embrión, pero al momento de descongelar y valorarlos observamos que en realidad eran dos embriones en total (ver cuadros 8 y 9).

Uno de los embriones, salió de la zona pelúcida, indicando que se encontraba vivo y en buenas condiciones (ver figuras 15, 16, 17 y 18); el otro embrión en blastocisto temprano, se encontró deforme y con numerosos espermatozoides pegados a la zona pelúcida (ver figura 19).

Cuadro 8.- Resistencia a la congelación

ESTADÍO	RESISTENCIA A LA CONGELACIÓN
Blastocisto temprano	Si
Blastocisto	Si
Ovocito	Perdido

Cuadro 9.- Total de embriones y ovocitos recuperados

Recuperados	%	Ovocitos	Embrión
6	85.71	4	2

Todos los ovocitos se encontraron en buenas condiciones, clasificándose en un grado 4. Los embriones en fase de blastocisto extendido y blastocisto temprano fueron clasificados en grados 3 y 2 respectivamente.



Figura 15.- Embrión fuera de la zona pelúcida



Figura 16.- Acercamiento del embrión

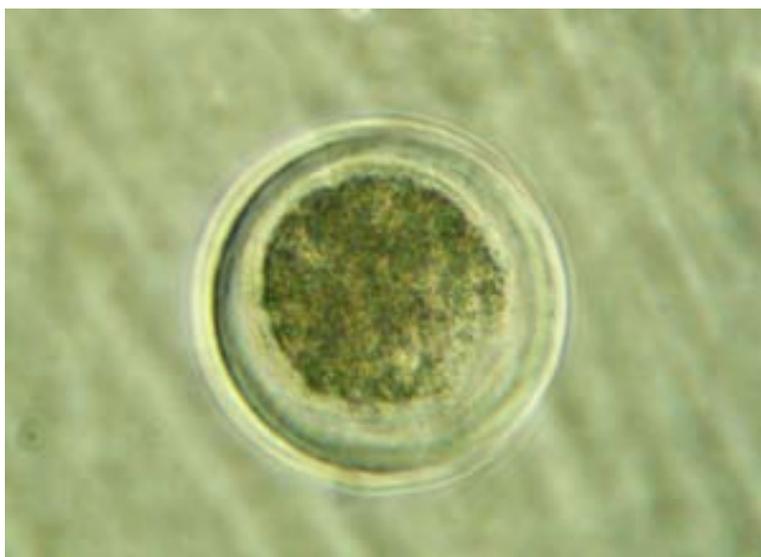


Figura 17.- Ovocito descongelado.

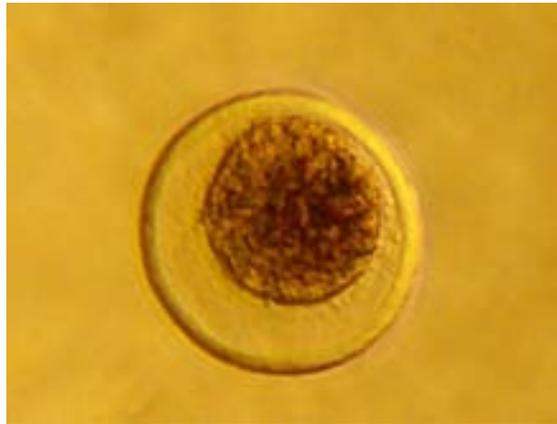


Figura 18.- Ovocito descongelado

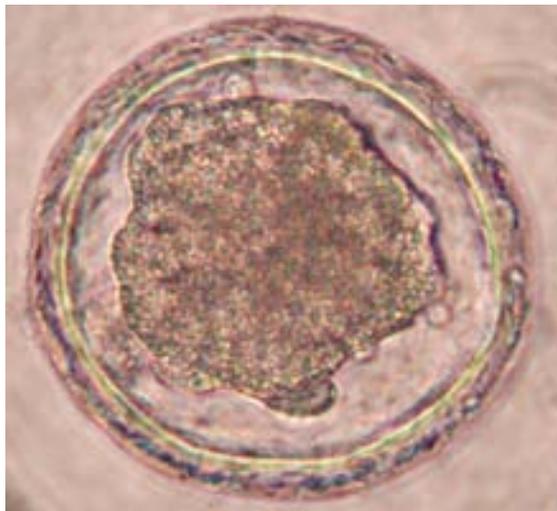


Figura 19.- Embrión con deformidades y gran cantidad de espermatozoides pegados a la zona pelúcida.

13. DISCUSIÓN

La mayoría de los experimentos de los autores mencionados en este escrito realizaron un tratamiento de superovulación por 4 días con dosis cada 12 horas, en nuestro experimento el tratamiento se llevo a cabo a las 11 a.m. y a las 6 p.m., solamente siete horas entre cada dosis, este factor bien pudo afectar la función hormonal, sin embargo, considerando que la FSH presenta una vida media de aproximadamente una hora, esto sugiere que la actividad hormonal dura menos de las 12 horas propuestas.

Generalmente en todos los protocolos de superovulación las dosis de FSH la manejan de manera decreciente y sólo utilizando esta hormona, sin la administración de LH, en un experimento realizado por Ake-López y col. (2003), se encontró que las ovejas tratadas sólo con FSH obtuvo una respuesta ligeramente mayor a las ovejas tratadas con FSH-LH, esto puede ser debido a que como lo menciona Bearden (1982) el nivel de LH liberada es adecuado para causar la ovulación de los folículos. Por lo tanto sería un gasto inútil incluir en el tratamiento la administración de LH.

Ahora bien este mismo autor menciona que la administración de LH puede incrementar la respuesta superovulatoria dependiendo de la raza, aunque esto tendría que estudiarse con detenimiento.

En los experimentos realizados por Ake-López y col. (2003), Bari y col. (2003), Peña (2006) entre otros, no administraban GnRH, puesto que se maneja la aplicación de un antagonista para provocar una inhibición temporal del crecimiento folicular y así obtener una ovulación múltiple; en nuestro experimento se aplicó la hormona sin ningún resultado visible, no se encontró ningún dato que nos indique que su aplicación ayuda a mejorar el tratamiento de superovulación.

Varios autores del tema de transferencia de embriones, mencionan que la edad, peso, estado nutricional y prolificidad de la raza, juegan un papel muy importante en cuanto a la respuesta, obviamente en las razas más prolíficas como la Romanov, Finesa se esperaría una buena respuesta a este tipo de tratamientos, además de que son razas que muestran una gran precocidad sexual ; también en sus estudios realizados, la dosis de la FSH es variable, encontrándose desde 176 mg (Ovagen), hasta 200(Folltropin-V) mg, mencionando altos porcentajes de ovulaciones y embriones recuperados, aunado a esto la monta fue dirigida. (Bari y col. 2003; Boggio. 1997; García-García, 2005).

Las ovejas elegidas para este experimento contaban con buena salud y nutrición, por lo cual, estos factores quedan descartados para pensar que por esto no

funciono el tratamiento. Otro de los factores a tomarse en cuenta es la edad, puesto que las ovejas contaban con una edad 4 años promedio; en cuanto al peso no se obtuvo lo que se esperaba, puesto que la oveja más pesada de 71Kg no obtuvo la respuesta esperada.

14. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que al realizar el tratamiento de superovulación y la sincronización de los celos, esperábamos obtener varios embriones por hembra, teniendo si acaso, una hembra sin respuesta.

Algunas de las sugerencias para el mejoramiento de un tratamiento de superovulación son:

- ♣ Dosis de FSH cada 12 horas exactas para lograr una buena respuesta a la superovulación, que es lo que manejan los diferentes autores.
- ♣ Tratar de buscar la dosis mínima de FSH pero efectiva para el tratamiento de superovulación en un medio definido, para así lograr un aumento genético en el rebaño con un gasto menor.
- ♣ Utilizar lotes de hembras de diferente edad para corroborar que la edad es un factor de suma importancia para el tratamiento.
- ♣ De igual manera se deberán utilizar hembras de diferentes razas, para poder comparar la eficacia del tratamiento de superovulación en cada una de ellas, sobretodo por la gran diversidad de medios en los que se encuentran los ovinos y que afectan directamente en la presentación de los estros.
- ♣ Montas dirigidas o bien inseminación artificial.

La técnica que utilizamos para la congelación y descongelación de embriones es una técnica que ya ha sido utilizada con éxito; al observar la morfología del embrión en blastocisto con el microscopio estereoscópico pudimos observar que una parte de la zona pelúcida se encontraba adelgazada, al cambiarnos al microscopio de contraste de fases, observamos que éste se había salido de la zona pelúcida, lo cual nos dice que se encontraba vivo y al momento de ser descongelado continuó con sus cambios embrionarios.

Al observar detalladamente uno de los ovocitos, pudimos comprobar que en realidad se trataba de otro embrión que habíamos tomado como ovocito, éste se encontraba deforme y con gran cantidad de espermatozoides pegados alrededor de toda la zona pelúcida.

Los ovocitos, se encontraron en buen estado, sin ruptura de la membrana, ni deformidades.

Lo anterior nos indica que la técnica de criopreservación de los embriones utilizada fue exitosa y la técnica de descongelado también estuvo correcta; ambas técnicas pueden ser utilizadas con relativo éxito.

El éxito de un tratamiento de superovulación no puede ser basado en las diferentes indicaciones de los autores, puesto que existen variaciones en cuanto a condiciones ambientales en las que se encontraban los animales, por lo tanto cada tratamiento debe realizarse de manera específica para cada rebaño o bien región.

15. BIBLIOGRAFÍA

Aké-López, J.R.; Heredia y A, M.; Alfaro, G. M.; Centurión, C.F.; y Rojas, R.O. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de ovejas Pelibuey. Vet. Méx. 2003; 34 (3): 225-233.

Bari, F.; Khalid, M.; Haresign, W.; Murray, A.; Merrell, B. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. Theriogenology 2003; 59, 1265-1275.

Bearden, J. H.; Fuquay, J. Reproducción animal aplicada. Ed. El Manual Moderno, D.F. México. 1982.

Berlinguer, F.; Leoni, G; Bogliolo, L.; Pintus, P.P.; Rosati, I.; Ledda, S. and Naitana, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. Theriogenology 2004; 61: 1477-1486.

Boiso, I., Principios básicos de criobiología. 1º Congreso ASEBIR, 2001; Barcelona, España, vol. 18, núm. 4.

Boggio, D, J.C. Sobrevivencia in vitro de embriones ovinos congelados convencionalmente preparados para transferencia directa en 1.5 M etilenglicol. Primer comunicado en Uruguay.Vet-uy, Agrgo y Veterinaria, 1997.

Borowczyk, D.A. y col. Preliminary report on pregnancy rates after transfer of cryopreserved and fresh embryos produced in vivo and in vitro in sheep. North Dakota State University, Fargo, U.S.A. 2003

Cabodevila, J.; Teruel, M. Criopreservación de embriones bovinos. En: Biotecnología de la reproducción (G. A. Palma, eds.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina, Capítulo X, pp. 49-174. 2001.

Cocero, M.J.; Díaz de la Espina, M.S. y Aguilar, B. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectans. Biol. Repro.2002; 66, 1244-1258.

FAO. Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. Roma, Italia 1995.

García-García, R.M.; González, B.A.; Domínguez, A.V.; Veiga, L.A. y Cocero, M.J. Culture of early stage ovine embryos to blastocyst enhances survival rate after cryopreservation. *Theriogenology* 2005; 63, 2233-2242.

Gibbons, A.; Cueto, M. 1991. Transferencia de embriones en ovinos. NTA. EEA. Bariloche. Documento en línea. <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/ovinos/tecnolo10.pdf>.

Gibbons, A.; Cueto, M. 1995. Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. NTA. EEA. Bariloche. Documento en línea. <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/ovinos/tecnolo10.pdf>.

Gordon, I. Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. En: *Laboratory production of cattle embryos* (I. Gordon, eds.). Cab International, Cambridge, UK, 1994. Capítulo 6, pp. 293-328.

Görlach, A. Transferencia de embriones en el Ganado vacuno. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1997.

Hafez, E. S. E. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2000.

Isachenko, V. y col. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology* 2003; 59, 1209-1218.

Lindner, G. M. Wright, R. W., Jr. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 1983. 20: 4, 407-416.

Massip, A.; Van Der Zwahlen, P; Ecotrs, E. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 1987. 27:69-79.

Molina, I.; Cervera, RP.; Duque, C.C.; Alfonso, J. y Romeu, A. Criopreservación de ovocitos humanos. Vitricación vs. Congelación. *Rev. Ibero. Fertilidad* 2004; 21(3).

Mucci, N. y col. Criopreservación de embriones bovinos. Taurus, Bs.As., 2006; 7(26):20-35.

Palasz, A.T.; Mapletoft, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotechnol. Adv., 1996, 14:127-149.

Niemann, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. Theriogenology 1991, 35:109-125.

Peña, V. M. Efecto del selenio y somatotropina recombinante bovina sobre la tasa de ovulación y calidad embrionaria en cabras estabuladas, sometidas a un tratamiento de superovulación con FSH. (Tesis de Maestría). Estado de México UNAM. 2006.

Rall, W.F. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. Anim. Reprod. Sci., 1992, 28:237-245.

Ruíz, D. M. F. Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. UNAM. México, 1998

Tanaka, H.; Ballarales, P.; Masaki, J.; Kanagawa, H. Biotécnicas con embriones. En: Teoría y práctica de la fecundación in vitro (H. Tanaka; P. Ballarales; J. Masaki y H. Kanagawa, eds.). Agencia de Cooperación Internacional del Japón, Valdivia, Chile, Capítulo V, pp. 59-80.1997.