

Universidad de Guadalajara

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

VITRIFICACION DE EMBRIONES DE CONEJA Y VACA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N

Manuel Antonio Candelas Zenteno

JOSE DE JESUS PONCE ROCHA

DIRECTOR DE TESIS

M.V.Z. M.C. Francisco Javier Padilla Ramírez

GUADALAJARA, JAL.,

JUNIO 1994

A MIS PADRES

MANUELA ZENTENO NAVARRO

RAFEL CANDELAS MORALES

A MIS HERMANAS

DORA ELENA

MARITZA

GUADALUPE

Y A UNA PERSONA MUY ESPECIAL QUE LLEVO EN MI CORAZON

ISABEL VERONICA HERRERA LUCERO

Y A MIS AMIGOS :

DR. GERMAN ELIZALDE

M.V.Z. JOSE DE JESUS PONCE

AT'N : MVZ. MANUEL ANTONIO CANDELAS ZENTENO

A MIS PADRES :

MARTHA ROCHA MARTINEZ

JACINTO PONCE CARDONA

A MIS HERMANOS :

CLARA

ANGELICA

JACINTO

A NUESTRO MAESTRO Y AMIGO :

M.C.M.V.Z. FRANCISCO JAVIER PADILLA RAMIREZ

AT'N. M.V.Z. JOSE DE JESUS PONCE ROCHA

CONTENIDO

Página

RESUMEN	X
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
JUSTIFICACION	6
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	8
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	25
DISCUSION	38
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFIA	41

La vitrificación es una técnica que ofrece una alternativa en la preservación de embriones, permitiendo obtener productos de mejor calidad, y aumentando su viabilidad. El presente trabajo se llevo a cabo en el Departamento de Producción Animal de la FMVZ de la U de G. El propósito de este estudio fue la estandarización de la técnica de vitrificación de embriones de coneja y su efecto sobre la viabilidad del embrión. Se realizaron 5 ensayos en conejas, donde se estandarizaron los protocolos de: recolección, clasificación y vitrificación. El promedio de embriones recolectados viables fue de 9.8 embriones por lavada. Los embriones recuperados se equilibraron en VS-1 y VS-2, vitrificados y descongelados en VS-3. Se obtuvieron resultados eficientes para MC con un total de 13 calidad A-1 y 9 calidad A-2; y para BT con un total de 2 embriones calidad A-1 y 4 calidad A-2, no así para 8-16 EJ, MNC y BL. Al realizarse la validación mediante vitrificación y transferencia en embriones de bovino, las MC y BT se comportaron igual en las categorías y calidad como los embriones de coneja al análisis morfológico; excepto por que ninguno mantuvo su ZP completamente redonda. El porcentaje de gestación fue del 28.57%, a partir de MC y BT.

Esta técnica mostro ser viable para utilizarse dentro del proceso de la producción y criopreservación de embriones de mamífero.

La vitrificación es un proceso nuevo para la criopreservación de embriones de mamífero. (12).

La técnica de congelación de embriones de mamífero es reportada primeramente por Whittingham en 1972. Realizan mas ensayos para mejorar la técnica Wood y Farra, Kasai en 1980, Miyamoto e Ishibashi, Szell y Shelton en 1986; y Trouson en 1987. (13).

Los primeros avances significativos en la criopreservación de embriones de ratón por vitrificación fueron realizados por Rall y Fary en 1985; utilizaron altas concentraciones de soluciones crioprotectoras las cuales se superenfrian y solidifican intra y extracelularmente en cristales durante el enfriamiento a temperatura de 4 grados centígrados sin la formación de hielo. (12).

Subsecuentemente las soluciones vitrificadoras fueron aplicadas en embriones de rata , bovino, coneja, y oveja. (4).

Se han hecho estudios sobre la congelación rápida de embriones de ratón por inmersión directa en el nitrógeno líquido (- 196°C) evaluando los efectos de los azúcares como crioprotectores (Rafinosa, Lactosa, sacarosa o Xylosa.). (9), (10).

C. A. Valdez evaluó los efectos del tiempo de equilibrio, recolección y desarrollo en la etapa de supervivencia en la solución vitrificadora de embriones de ratón, obteniendo alta supervivencia manteniendo en inmersión por 10 minutos, independientemente del estado de desarrollo del embrión. Además confirma con el microscopio electrónico la ausencia de cristales con la solución vitrificadora. (1), (4).

Y. Takahachi en 1990 en la Universidad de Hokkaido estudio los efectos del periodo de equilibrio en el congelado y descongelado rápido de mórulas de ratón en la sustancia vitrificadora. (2), (8).

O. Abas Mazni en 1990 expone un simple método de criopreservación utilizando una solución con baja toxicidad (etilen glicol, lactosa o suero) y sin perdida en la viabilidad embrionaria. (14).

C. A. Valdez en 1991 establece el efecto de la dilución tri lateral en la supervivencia de mórulas de ratón con la vitrificación. (13).

Los factores que afectan la supervivencia de los embriones con sustancias crioprotectoras, incluyen la concentración y composición de las mismas, así como también sobre la susceptibilidad de embriones de conejo a la vitrificación en diferentes estados de desarrollo; los embriones de 8 a 10 células tienen una tasa de supervivencia del 92.9 % comparada con un 43.8 % de embriones de 1 a 2 células. (5), (6), (7), (15).

N. Saito, K Imai y M. Tomizawa en su estudio concluyen, que la adición de azúcares (sucrosa y dextrosa) a las soluciones vitrificadoras (glicerol y propanadiol); aumentan la supervivencia de los blastocistos vitrificados independientemente de su estado, y que soluciones sin azúcares no son recomendables para la vitrificación de los mismos. (11).

Este material genético puede ser transferido en fresco o bien preservarlo por medio de la congelación o vitrificación. De esta forma da oportunidad a la realización de programas de sincronización. Además el congelado de embriones por vitrificación disminuye costos al ser exportados o importados comparado con animales en pie, y a la vez mayor numero de material a seleccionar para el comprador. Aunque el material sea importado los terneros son sanos y no requieren de un periodo de adaptación por ser nacidos en el país, entre otras ventajas.

La técnica de congelación comúnmente utilizada en México es por el método de sembrado: se basa en la inducción artificial de formación de cristales de hielo en o cerca del punto óptimo de congelación de la solución, evitando un posible daño o efecto por el enfriamiento.

La velocidad de enfriamiento (congelamiento manual) puede ser lento o rápido, disminuyendo ciertos grados centígrados por minuto. Pero generalmente el sembrado o cristalización se realiza cuando el termómetro marca de -3.5 a -4 °C; continuando el enfriamiento hasta llegar a -32 °C. (3).

El profesional dedicado a la producción animal, empleando la biotecnología, se enfrenta a muchos problemas relacionados con la capacidad productora de los animales que garanticen su valor. La transferencia de embriones requiere de algunas condiciones como sincronización, superovulación, transferencia en fresco y congelación para su posterior implantación.

Existen varios métodos de preservación de embriones, el tradicional o congelación manual, o bien; los modernos congeladores programables computarizados. Actualmente el avance en las investigaciones ha dado lugar a una nueva técnica, la vitrificación, de resultados alentadores.

Si bien la congelación rápida reduce al mínimo el daño por los efectos de la solución, ello conduce a la formación de grandes cristales de hielo intracelular que causa grave daño mecánico. Por otro lado, aunque la congelación lenta evita la formación de grandes cristales de hielo, esta conduce a un incremento en el daño producido por los efectos de la solución.

Normalmente se crean cristales intracelulares con o sin presencia de los extracelulares en la congelación de embriones. Estos cristales, al momento de descongelar la pajilla, debido al aumento de la presión intracelular, hacen que la membrana se rompa y se desintegren los blastómeros.

La vitrificación tiende a mejorar la viabilidad del embrión. En esta se han utilizado diferentes concentraciones de sustancias crioprotectoras extra e intracelulares con resultados variables que dependen de: enfriamiento del medio, naturaleza y concentración del crioprotector usado, tipo de congelador programable y punto de congelación.

En México no existen datos acerca del uso de la técnica de vitrificación. Debido a la poca actividad en este ramo de la congelación como alternativa en la transferencia embrionaria. La forma común de congelación es con ayuda del congelador programable y realizando la cristalización. (3).

JUSTIFICACION

6

En México se están practicando métodos como la superovulación, el lavado de embriones, transferencia de embriones y producción de embriones in vitro (fertilización in vitro).

Estos métodos son cada vez mas perfeccionados a tal grado que no hay que implantar los embriones en el momento de su recolección, sino que se han presentado las alternativas de madurarlos, refrigerarlos y hasta congelarlos por diferentes métodos. Cabe señalar que el método para conservación mas utilizado es la congelación, el cual tiene varios inconvenientes en cuanto a la cristalización de los embriones por el mal manejo de la técnica de criopreservación.

Debido a esto es necesario estandarizar una nueva técnica que permita concentraciones elevadas de soluciones crioprotectoras. Esta nueva alternativa es la vitrificación que evita la formación de cristales intra y extracelularmente y, además permite obtener una curva de congelación baja, mayor rapidez de congelación, menor costo y mayor calidad de los productos que con otras técnicas de criopreservación, sugiriendose como una alternativa más para la técnica de la transferencia de embriones.

Además, el presente trabajo aportara datos que sirvan a los profesionales dedicados a la biotecnología acerca de las ventajas de esta técnica y su aplicación en la transferencia de embriones.

El uso de diferentes técnicas de criopreservación permitirá una mayor eficiencia para la obtención de animales con características genéticas más productivas y si esto se complementa con la reducción en los costos de la técnica, esto supondrá un uso cada vez más extenso y su aplicación en las explotaciones pecuarias.

Si con el uso de la técnica de vitrificación de embriones de mamífero hay una menor variación en la toxicidad, presión intracelular, tiempo de exposición y temperatura, esto evitara el estallamiento del embrión por la cristalización de los líquidos extracelular e intracelular, aumentando el porcentaje de viabilidad de los embriones al momento de implantarlos.

OBJETIVOS

8

GENERAL:

Estandarizar la técnica de vitrificación en embriones de coneja y vaca.

PARTICULAR:

1.- Evaluar si la técnica de vitrificación ofrece porcentajes adecuados de viabilidad de los embriones de coneja y vaca.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Departamento de Producción Animal de la FMVZ de la Universidad de Guadalajara, que cuenta con la infraestructura suficiente para estandarizar la técnica de vitrificación de embriones. El estudio se realizó en el período comprendido entre los meses de octubre y noviembre de 1993.

El material biológico (conejas) se obtuvo del Zooterio de la Facultad de Medicina Veterinaria. Se utilizaron conejas de la raza Nueva Zelanda de 6 meses de edad, con monta controlada, las cuales fueron cubiertas con machos de fertilidad probada.

Se realizaron 5 ensayos que comprendieron desde monta hasta vitrificado y evaluación. El número de embriones dependió de la respuesta individual de las conejas.

Fueron superovuladas con 5 U.I. de Gonadotropina Serica de la Yegua Preñada (PMSG) vía intraperitoneal, seguida de una inyección de Godanotropina Corionica Humana (HCG) 5 U.I. vía intraperitoneal. El apareamiento se realizó doce horas después de la aplicación de las hormonas. Posteriormente se sacrificaron a los 3 días post-coito, por medio de desnucamiento. Con ayuda del estuche de disección estéril, así como de gasas, se procedió a retirar la matriz desde cuello uterino hasta ovarios. Con una cánula y venoclis se insertó en ambos oviductos inyectandose solución PBS+20% FCS. El lavado fué en dirección oviductos en su parte más anterior a ovarios (fimbria), hasta cuello uterino. Los embriones se recobraron en cajas de petri cuadriculada, y se mantuvieron en equilibrio a temperatura ambiente en PBS+20% FCS. Esperando encontrar en esta etapa embriones de 16 células, morulas tempranas o compactas hasta blastocistos.

Se evaluaron los embriones morfológicamente al microscopio antes de vitrificarlos tomando fotografías de los mismos. Los criterios de evaluación los realizo un técnico calificado. Las categorías de embriones calidad 3 y sin fertilizar fueron descartados para el proceso de vitrificado.

Todo el material utilizado se sometió a lavado y esterilizado. Cajas de petri multihoradadas (35 mm), cajas de petri cuadrículadas, unopettes, jeringas de insulina, jeringas de 5 y 10 ml sin embolo de plástico (propileno); filtros de .22 y .45 micras, agujas del numero 18 y 20, cilindros graduados de 10 ml.

Se mantuvieron sumergidas en agua con jabón extran al 2% por 24 horas, posteriormente se lavaron con agua corriente y vueltas a sumergir en agua bidestilada. Una vez enjuagados se secan con pistola de aire caliente, empaquetadas y selladas en bolsas de plástico. Se esterilizaron a 50°C durante 1 hora en el pupinel. También se esterilizaron gasas, guantes y papel sanitario. Se dio mantenimiento a 2 microscopios estereoscópicos.

7.1 CRITERIOS DE EVALUACION

Como metodología práctica para determinar la calidad del embrión, se utilizan parámetros de evaluación morfológica que se sabe están correlacionados con la viabilidad y/o supervivencia del embrión (criterios retomados de bovinos).

Para la clasificación de los embriones se utilizó un microscopio estereoscópico de 40 aumentos. Esta fase del protocolo fué realizada por una sola persona.

Basados en dos parámetros morfológicos principales:

1.- La etapa de desarrollo en la cual se encuentra el embrión.

EDAD DEL EMBRION (DIAS)	ETAPA
3-4	4 a 8 células.
4-5	Embrión 16 células.
6	Morula (compactada).
7	Blastocisto, temprano.
7 - 7 1/2	Blastocisto.
8	Blastocisto anidado y expandido.

2.- Las características físicas del embrión.

Los embriones se evaluaron de acuerdo a sus características físicas, tales como la forma del embrión, condición de la zona pelúcida, tamaño del espacio perivitelino. La compactación, extrusión y grado de degeneración de los blastómeros; desechos, color y distribución del citoplasma. Los embriones se clasificaron de acuerdo a su calidad como:

A) Los embriones calidad 1 pueden presentar ligeras imperfecciones, tales como zona pelúcida distorsionada o algunos blastómeros extruidos (A1) pero no deben mostrar reducción aparente en la masa celular.

B) Los embriones calidad 2 son aquellos cuyos blastómeros han sufrido extrusión de tal manera que el resultado es una disminución importante del tamaño de la masa celular (estos casos, se observa "embriones pequeños" rodeados de blastómeros de diferentes tamaños y grado degenerativo). También se clasifican embriones número 2 a todos aquellos que presentan citoplasma oscuro y granular, o bien, de color mas claro de lo normal, o con evidencia de degeneración de blastómeros (membranas celulares rotas o vesículas citoplasmáticas).

C) Los embriones calidad 3 presentan blastómeros extruidos y/o degeneración al grado de que sólo existe un pequeño porcentaje de células vivas (menos del 50%) apareciendo como una pequeña mórula o blastocisto rodeado de numerosas células degeneradas de diferentes tamaños y formas. Otro tipo de embriones número 3 son los que no presentan gran cantidad de blastómeros extruidos, pero a cambio se observa una severa degeneración de blastómeros en sí. (3).

7.2 CODIGO PARA LA CLASIFICACION DE EMBRIONES.

CODIGO	ETAPA	CODIGO	CALIDAD
UNF	Sin fertilizar	1	Embrión No. 1
8-16	Embrión con 16		
EJ	células o menos	2	Embrión No. 2
MNC	Mórula no compactada	3	Embrión No. 3
CM	Mórula compactada	4	Embrión No. 4
BT	Blastocisto temprano		
BL	Blastocisto	ZP	Zona pelúcida
XB	Blastocisto expandido		
HB	Blastocisto anidado		

7.3 PREPARACION SOLUCION SALINA BUFERADA CON FOSFATOS DE DULBECCO (PBS).

En 1000 ml de Agua Esterilizada Inyectable se disolvió el sobre de medio conteniendo 1000 mg/L Glucosa, 36 mg/L Piruvato de Sodio más 5 mg/L Rojo de Fenol; verificando que los grumos formados se disuelvan completamente al ser agitada la solución. Entonces se agregó un segundo sobre conteniendo medio 0.1 g/L de Clorhidrato de Calcio para PBS, esta vez girando moderadamente la solución no bruscamente, para así evitar la formación de espuma, pero cuidando que se mezcle perfectamente.

Con 10 ml de solución PBS se reconstituyó el Suero Fetal Bovino (FCS), que además contiene Penicilina 10 000 U.I./ml, 10 000 mcg/ml de Estreptomicina y un Fungal 25 mcg/ml. Estos 10 ml FCS se mezcló con los 1000 ml de PBS disolviendolo como el anterior evitando formación de espuma.

7.4 PREPARACION DE SOLUCION VITRIFICADORA (VS).

Se utilizaron tubos de ensaye graduados para preparar las soluciones vitrificadoras con las siguientes concentraciones:

VS-1 : PBS.....7 ml. (PBS+20% FCS).

PROPANADIOL.....2 ml.

GLICEROL.....1 ml.

VS-2 : PBS.....5 ml.

PROPANADIOL.....2.5 ml.

GLICEROL.....2.5 ml.

Después de la preparación de la solución se filtró (Millipore 0.45 micras), y se colocó en un contenedor con agua más hielo y manteniéndolo a temperatura dentro de una extensión de 0 a 4°C.

Mientras tanto se prepararon los materiales de procedimiento para el congelado; pajilla de 0.25 ml, jeringa insulina, unopettes, cajas de petri multihoradadas.

Se hizo la transferencia de la solución VS-1 y VS-2 a una caja de petri multihoradada (6 cavidades), y se colocaron en el paquete de hielo (0 a 4°C).

Se transfirieron los embriones de PBS a la solución VS-1 y se mantiene en ella por 10 minutos. Entonces son pasados los embriones a la solución VS-2 y se mantienen en ella por 60 a 90 segundos.

Se procedió al cargado de la pajilla con la solución VS-2 de la siguiente manera: VS-2, aire, VS-2 + embrión; aire, VS-2. Se sella el extremo de la pajilla con polivinil (PVC) y por el otro extremo se coloca un tapón para pajillas (varilla de identificación) anotándose en esta el tipo de embrión.

Inmediatamente después se colocaron las pajillas en gobelets fijos a los bastones dentro de la canastilla del termo de nitrógeno líquido (NL) y se mantiene esta en el cuello o parte superior del termo donde se encuentra el vapor de NL. Se repitió el proceso con todos los embriones a vitrificar. (8), (9), (14).

La otra parte de la metodología consistió en hacer el descongelado de los embriones vitrificados:

A) Se preparó la solución Sucrosa (VS-3), solución que rehidrata al embrión. Para esto se peso 3.42 gramos de sucrosa, colocándose en un cilindro graduado (tubo ensayo) de 10 ml. Se completan con PBS + 20% FCS hasta 10 ml, posteriormente se filtra y permanece a temperatura ambiente.

B) El deshielo de la pajilla se hizo sumergiendola en agua a 20°C hasta que el hielo desaparece (20 segundos). El extremo de la pajilla sellada con PVC se corta y se vacia la solución vitrificadora VS-2 + embrión en la caja de petri multihoradada que contiene VS-3. A qui se mantuvo por 5 minutos y después se lava 3 veces en solución PBS + 20% FCS.

C) Después de haber sido lavados los embriones con solución PBS se evaluaron individualmente desde el punto de vista morfológico (mismo evaluador), para observar y comparar sus estructuras antes del vitrificado y después del descongelado, se volvió a tomar fotografías de los mismos. (8), (9).

Para validación de la técnica de estandarización hecha en conejas, fue necesario llevar a cabo una prueba en mamíferos superiores como lo es el bovino.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Transferencia de embriones. Ubicado a 3 km carretera Lagos de Moreno - Union de San Antonio; propietarios Hermanos Sanroman Ortiz quienes manejan Suizo Europeo. Los animales fueron vacunados previamente con triple y anticarbonosa; posteriormente se realizaron pruebas de Brucela y Tuberculina tanto en donadora como receptora. La vaca donadora fue de tercer parto, siendo este último el día 26 de octubre, presentando su primer calor el día 19 de noviembre, y su segundo calor para el día 10 de diciembre de 1993. En su primer calor se desparasito y vitamino. Iniciando a la vez una alimentación suplementaria de 3 kg/día de forraje (16% Proteína y 18% Energia), aumentandose al tercer día a 6 kg por 9 días más. Las receptoras a transferir se prepararon 15 días antes, aumentandose la ración del forraje de buena calidad a 3 kg/día. Estas variaron de primero a segundo parto. tanto donadora como receptoras se les agregó a su ración 100 g/día/animal de mezcla de minerales. Se dió inicio del programa de superovulación con FSH*P el día 20 de diciembre p.m., con dos aplicaciones diarias a.m. y p.m.; con intervalo de 12 horas entre aplicación. Al tercer día de iniciado el programa, se le aplicó además de la hormona 7cc de Lutalyse* a.m. y 2cc por la tarde. El programa hormonal terminó al cuarto día de iniciado, presentando calor 2 días después por la mañana, inseminandose a.m. y p.m.; y al siguiente día a.m., aplicandose 1, 2 y 1 dosis respectivamente. En la segunda inseminación se aplicó 2 cc de GnRH. La hormona FSH*P viene en una presentación de 50 mg, con diluyente de 10 cc. Para lo cual se diluyó a razón de 4 cc de suero fisiológico por cada 1 cc de FSH*P; utilizandose 40 cc de suero mas 10 cc del diluyente. Se emplearon un total de 40 mg de FSH*P, la dosis y día de su aplicación se muestra en el cuadro no. 1.

CUADRO No. 1 PROGRAMA DE SUPEROVULACION

No. JERINGA	DOSIS (EN cc.)	DIA	
1	6	20 dic 1993	p.m.
2	6	21 dic	a.m.
3	5		p.m.
4	5	22 dic	a.m.
5	4		p.m.
6	4	23 dic	a.m.*
7	4		p.m.*
8	3	24 dic	a.m.
9	3		p.m.
	Calor I.A. 1 Dosis	26 dic	a.m.
	I.A. 2		p.m.⊗
	I.A. 1	27 dic	a.m.
	Lavado y Recolección	2 ene	p.m.

* 7 y 2 cc Lutalyse.

⊗ 2cc GnRH.

Las jeringas fueron numeradas del 1 al 9, anotando la dosis en cc, la fecha del día y hora de su aplicación, además del número de la donadora. Empaquetadas en una bolsa de plástico se almacenaron en congelación. Para su aplicación se procedió a descongelarse a temperatura ambiente e inyectarse en forma intramuscular.

El lavado y recolección de embriones se realizó a los siete días después de presentar celo e inseminar. La donadora es sujeta en una prensa de manejo, en ese momento se palpaban los ovarios anotándose el número de Cuerpos Luteos (CL) encontrados en cada ovario.

Se procedió al bloqueo epidural con 5 cc de lidocaina previa asepsia del área. La cola es sujeta por un asistente, la sonda Foley del no. 18 es insertada en el estilete (desinfectado con alcohol) por el técnico recolector. Separando los labios vulvares es introducida la sonda hasta el cuello poco antes de la bifurcación uterina; y con ayuda de una jeringa se inyecta en la sonda suero fisiológico que a la palpación del técnico determinó la presión de la bombilla o globo sobre el endometrio.

Se retira el estilete y se conecta el tubo de 2 vías con bolsa receptora la cual contiene medio PBS + 20% FCS que fue preparado siguiendo las descripciones anteriores. Una vía es conectada a la sonda y la otra al filtro recolector llenándolo una cuarta parte para recibir los embriones. Cerrando la vía que llega al filtro es depositado medio a los dos cuernos hasta que se logre la separación total de las paredes del endometrio, a la vez que se le da un masaje suave a los cuernos. Se cierra esta vía y se abre la comunicación al filtro. Así alternando las vías de irrigación son lavados los cuernos con 1 litro de medio PBS. (3).

Se retiran las dos vías de irrigación, se extrae el agua que ocupa el globo de la sonda retirandola de la matriz. El filtro es protegido de los rayos solares y llevado al laboratorio para la localización embrionaria. Este medio fué depositado en una caja de petri cuadrículada, dejando unos minutos en reposo para su sedimentación.

Todo el material y preparación de soluciones VS-1, VS-2, VS-3; el método de vitrificado y descongelado fué realizado de acuerdo a la técnica ya descrita para estandarización de embriones de coneja.

Todas las respuestas en relación a la producción de embriones se vaciaron en formatos previamente establecidos (se anexan).

TRANSFERENCIA

Se checaron calores por la mañana y tarde por espacio de una hora, y conforme las receptoras presentaron celo se dejaron pasar siete días, que de acuerdo a la edad del embrión fueron transferidas por la mañana (a.m.) o por la tarde (p.m.).

Llegado el séptimo día se palpó a la receptora anotándose y marcando el lado derecho o izquierdo dependiendo donde se encuentre el CL en el ovario. Posteriormente se procedió a descongelar el embrión a transferir, evaluándose morfológicamente. Se cargo la pajilla de 0.25 ml (previamente recortadas 2 cm) con el embrión (VS-2, aire, VS-2 + embrión; aire, VS-2).

En seguida se colocó la pajilla en la pistola de transferencia cubriéndose con una funda de inseminación, asegurándola en su parte distal. A esta se le protege con una camisa sanitaria y se resguarda de la luz.

La receptora se inmovilizó y recibió anestesia epidural, limpiando con papel sanitario la región vulvar. Sosteniendo los labios vulvares, se penetró la pistola hasta alcanzar el primer anillo del cervix; se retrae entonces la camisa y se sigue avanzando la pistola a través del cervix, dirigiéndola hacia el cuerno uterino ipsilateral al CL. Alcanzando el tercio distal del cuerno se deposita el embrión.

Las receptoras transferidas que no repitieron calor fueron palpadas a los 2 meses de transferidas.

Los parámetros que se evaluaron fueron:

a) Calidad antes de vitrificarlo y post-descongelamiento
(conejas).

b) Porcentaje de gestación (vacas).

FORMATO No1 REPORTE DE LAVADO DE EMBRIONES										
REPORTE DE LAVADO DE EMBRIONES							FECHA DE INC. PROGRAM. _____			
No. LAVADO	FECHA DE LAVADO	HORA	DONADORAS			MGRS. FSH	RAZA	TORO	No. SERV.	
			No. IND.	No. COLEC.	No. PARTO				LA	MD

TOTAL EMBRIO RECOLEC	CUERPO LUTEO		VIABL	DEGEN	TRANSFERIDOS EN FRESCO								CONGELADOS								TOTAL TRASFER Y CONGEL	
					BLASTOCITOS				MORULAS				BLASTOCITOS				MORULAS					
	IZQ	DER			A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2		

OBSERVACIONES : _____

REALIZARON EL PROGRAMA	SUPERVISARON
------------------------	--------------

FORMATO 3.

REPORTE DE TRANSFERENCIA Y PALPACION DE GESTACION

	No. RECEPTORA	FECHA TRANSFER	FECHA REP.CALOR	CALIDAD EMB		FECHA PALPACION	GESTACION	
				MORULA	BLAST		POST (+)	NEG (-)
FECHA DE LAVADO								
DONADORES								
No. LAVADO INDVID								
TORO								
No. EMBRIONES VIABLES								
PORCENT DE FERTILID								

OBSERVACIONES :

LAVADO

TRANSFERENCIA

PALPACION

El efecto de la vitrificación sobre la viabilidad post-descongelamiento de embriones de coneja se presentan en el cuadro no.2 . El grado de degeneración observada por efecto de la vitrificación sobre la calidad de los embriones mostro que; embriones de 8-16 EJ sufrieron degeneración (extrusión) en por lo menos uno de sus blastomeros. Las MNC de las conejas 3, 4 y 5 tuvieron daños, apreciandose vesículas pequeñas que afectan una decima parte de la masa celular. Las MC no sufrieron daño en su ZP, ni perdieron su compactación; excepto por los 2 embriones calidad A-1 de la coneja no. 2, a los cuales se les observo una vesícula pequeña . Además dos embriones calidad A-2 de la coneja no. 4 presentaban una masa celular transparente. Los BT no sufrieron cambios aparentes. Los BL de las conejas 3, 4 y 5, su ZP nunca fue esférica después del descongelado.

Los resultados del numero de embriones recuperados viables para vitrificar, calidad antes de vitrificarlos y post-descongelado se muestran en el cuadro no. 3. De los 5 ensayos realizados, la primera coneja se recuperaron 8 embriones (7 viables y 1 UNF), en la segunda fueron 9, todos viables; en la tercera 10 (8 viables y 2 UNF), la cuarta 9 embriones todos viables, y la quinta coneja 13 (12 viables y 1 UNF).

Se observo morfológicamente que en los embriones de 8-16 EJ calidad A-1 antes de vitrificar (AV) son embriones juvenes (4 1/2 días), presentando sus blastomeros bien definidos, su ZP redonda; post-descongelamiento se observan extrusiones de 1 o mas blastomeros, su ZP no pierde su redondez, clasificandose calidad B-1.

Las MNC calidad A-1 (5 1/2 días), AV; muestran ZP redonda, masa celular amplia y definida sin irregularidades en sus bordes. PD su masa celular en un extremo de su periferia se detecto una irregularidad por la presencia de una vesícula, ocupando 1/4 parte, quedando como calidad B-1. Las de calidad B-2 la degeneración redujo la masa celular a un 50%.

Las MC calidad A-1 (6 días), AV.; se observa ZP redonda, gran masa celular de apariencia oscura (foto no. 1); PD, presencia de vesícula en la periferia de la masa celular, su ZP no tubo cambios, calificandose como calidad A-2. La de calidad B-1 además de la presencia de vesícula, su masa celular es transparente. (foto no.2).

En cuanto a los BT calidad A-1 (6-1/2 a 7 días), AV.; su ZP son redondas, compactación celular y presencia del espacio trofoblastico(foto no.3), PD; no se observaron cambios aparentes quedando como calidad A-1. El A-2 AV; aparece con una pequeña vesícula en el extremo posterior al espacio trofoblastico, el resto de la masa celular es compactada, PD; no se observaron cambios aparentes, quedando como calidad A-2. (foto no.4).

Los BL calidad A-1 (7 a 7 1/2 días), AV.; ZP redonda, su espacio trofoblastico ocupando el 50 a 60% de la masa celular, PD; la ZP no es esférica, como calidad A-2.

Los resultados de la validación de la técnica de vitrificación y transferencia de embriones en vacas se presenta en el cuadro no. 4. El total de embriones recolectados fueron 16; 2 BT calidad A-1 (foto no. 5), 2 BL calidad A-1, 3 MC calidad A-1 (foto no. 6); estas fueron utilizadas para la prueba. De los 9 embriones restantes, 6 estaban degenerados calidad A-3 y 3 UFN, no se tomaron en cuenta para la prueba.

Siguiendo el mismo criterio de evaluación morfológica PD, las MC calidad A-1 no perdio su compactación, la ZP no era completamente esférica (foto no. 7). Los embriones BT no sufrieron daño al descongelarse, excepto por su ZP no guardó su redondez. Los embriones BL mostraban ZP ovalada y traslucida su masa celular. El grado de degeneración del embrión observada por efecto de la vitrificación se presenta en el cuadro no. 5.

Las receptoras transferidas números 48, 36, 14, 48 (segunda transferencia) y 24 repitieron calor. Dos fueron las receptoras diagnosticadas gestantes; la receptora número 12 y 09, transferidas con MC calidad A-2 y BT calidad A-2 respectivamente. Por lo tanto el porcentaje de gestación fué del 26.57%. Los reportes del lavado, transferencias y palpación de gestaciones se presentan en los formatos números 1, 2 y 3.

**CUADRO No. 2 EFECTO DE VITRIFICACION SOBRE LA VIABILIDAD
POST-DESCONGELAMIENTO (PD) DE EMBRIONES DE CONEJA**

	1	2	3	4	6
EMBION CON 16 CELULAS O MENOS (8-16 EJ)	DG*			DG	
MORULA NO COMPACTADA (MC)		NDG	DG	DG	DG
MORULA COMPACTADA (MC)	NDG	(A2) NDG (A2) DG	NDG	(A2) DG (B1) DG	NDG
BLASTOCITO TEMPRANO (BT)		NDG	NDG		NDG
BLASTOCITO (B)			DG		(A2) DG (A2) NDG

* DG = DEGENERACION ; NDG = NO SE OBSERVO DEGENERACION.

ENTRE PARENTESIS LA CALIDAD DEL EMBRION.

NOTA : EL GRADO DE DEGENERACION SE CITA EN EL CUADRO No.3

**CUADRO No. 3 GRADO DE DEGENERACION DEL EMBRION OBSERVADA
POR EFECTO DE LA VITRIFICACION**

	1			2			3			4			5		
	R	AV	PD	R	AV	PD	R	AV	PD	R	AV	PD	R	AV	PD
EMBION CON 16 CELULAS O MENOS (8-16 EJ)	3	A1	B1							2	A1	B1			
MORULA NO COMPACTADA (MNC)				3	A2	A2	2	B1	B2	1	A2	B1	1	A2	B2
MORULA COMPACTADA (MC)	3	A1	A2	3	A2	A2	4	A1	A1	4	A1	A2	3	A2	A2
	1	A2	A2	2	A1	A2				2	A2	B1			
BLASTOCITO TEMPRANO (BT)				1	A1	A1	1	A2	A2				1	A1	A1
													3	A2	A2
BLASTOCITO (BL)							1	A1	A2				3	A1	A2
													1	A2	A2

R= RECUPERADOS

AV= ANTES DE VITRIFICADOS

PD= POST-DESCONGELADOS

* CRITERIO DE ACUERDO A (MARTIN W. 1990).

CUADRO No. 4 VITRIFICACION Y TRANSFERENCIA EMBRIONES BOVINOS

No. RECEPTORA	CALIDAD DE EMBRION * TRANSFERIDO			DIAGNOSTICO DE GESTACION
	MC	BT	BL	
48		A-2		NEGATIVO
12	A-2			POSITIVO
36	A-2			NEGATIVO
09		A-2		POSITIVO
14	A-2			NEGATIVO
48			A-2	NEGATIVO
24			A-2	NEGATIVO

* CRITERIO DE ACUERDO A (MARTIN W. 1980).

**CUADRO No. 5 GRADO DE DEGENERACION DEL EMBRION OBSERVADA
POR EFECTO DE LA VITRIFICACION *
(VACA)**

	R	AV	PD
EMBION CON 16 CELULAS O MENOS (8-16 EJ)			
MORULA NO COMPACTADA (MNC)	*		
MORULA COMPACTADA (MC)	3	A-1	A-2
BLASTOCITO TEMPRANO (BT)	2	A-1	A-2
BLASTOCITO (BL)	2	A-1	A-2

R= RECUPERADOS

AV= ANTES DE VITRIFICADOS

PD= POST-DESCONGELADOS

* CRITERIO DE ACUERDO A (MARTIN W. 1990).

FORMATO No1 REPORTE DE LAVADO DE EMBRIONES

REPORTE DE LAVADO DE EMBRIONES FECHA DE INIC. PROGRAM. 20/12/93

No. LAVADO	FECHA DE LAVADO	HORA	DONADORAS			MGRS. FSH	RAZA	TORO	No. SERVS.	
			No. IND.	No. COLEC.	No. PASO				LA	MD
30	2/01/94	10:00	384	7	3º	40	SUIZO EUROP	ARON	4	

TOTAL EMBRIO RECOLEC	CUERPO LUTEO		VI AB L	DE GEN	TRANSFERIDOS EN FRESCO												CONGELADOS				TOTAL TRASFER Y CONGEL
					BLASTOCITOS				MORULAS				BLASTOCITOS				MORULAS				
	EQ	DER			A1	A2	B1	B2	A1	A2	B1	B2	A1	A2	B1	B2	A1	A2	B1	B2	
16	9	?	7	9													1	2			7

OBSERVACIONES : REDUCIR LOS MG. DE FSH POR LA RAZON DE QUE EL OVARIO DERECHO
 SUPER-OVULO DEMASIADO A TAL GRADO QUE NO SE LOGRARON CONTAR LOS CUERPOS LUTEOS

<p>REALIZARON EL PROGRAMA</p> <p>RAUL MARTIN M.</p>	<p>SUPERVISARON</p> <p>JAIIME SANROMAN O., J. JESUS PONCE R. ANTONIO CANDELAS Z.</p>
---	---

FORMATO No.2

REPORTE DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

FECHA. _____

NO. T R A N S F	RECEPTORA		CALOR		TRANSFE		LAPSO DE TIEMPO	No. DE DONAD	TORO	EMBRION		TIPO		C. LUTIO	
	No.IND	No.TRANS	FECHA	HORA	FECHA	HORA				F R E S	CONG	MOR	BLAS	ESQ	DER
195	48	1º	31/12/93	6:00 AM	07/01/94	9:00 AM		384	ARON	*		BT A-2			
196	12	2º	04/01/94	6:00 AM	04/01/94	9:00 AM		384	ARON	*	MC A-2				
197	36	2º	04/01/94	6:00 AM	04/01/94	9:00 AM		384	ARON	*	MC A-2				
199	09	2º	04/01/94	6:00 AM	11/01/94	6:00 AM		384	ARON	*		BT A-2			
200	14	1º	04/01/94	6:00 AM	11/01/94	9:00 AM		384	ARON	*	MC A-2				
207	48	1º	24/01/94	6:00 AM	24/01/94	6:00 PM		384	ARON	*		BL A-2			
208	24	2º	24/01/94	6:00 AM	24/01/94	6:00 PM		384	ARON	*		BL A-2			

FORMATO 3.

REPORTE DE TRANSFERENCIA Y PALPACION DE GESTACION

		No. RECEPTORA	FECHA TRANSFER	FECHA REP.CALOR	CALIDAD EMB		FECHA PALPACION	GESTACION	
					MORULA	BLAST		POST (+)	NEG (-)
FECHA DE LAVADO	2/01/94	48	7/01/94	21/01/94		BT A-2			
DONADORES	384	12	10/01/94		MC A-2		10/03/94	**	
No. LAVADO INDIVID	19	36	10/01/94	26/01/94	MC A-2				
TORO	ARON	09	11/01/94			BT A-2	10/03/94	**	
No. EMBRIONES VIALES	7	14	11/01/94	26/01/94	MC A-2				
PORCENT DE FERTILD	28-57	48	28/01/94	12/02/94		BL A-2			
		24	28/01/94	13/02/94		BL A-2			
OBSERVACIONES : AL DESCONGELARSE SE REQUIERO DE MAS TIEMPO EN VS-3 10 MINUTOS									
SE MANTUVO PARA SU COMPLETA HIDRATAACION. LA ZONA PELUCIDA NUNCA FUE COMPLETAMENTE									
ESFERICA EN NINGUN EMBRION UNA VEZ DESCONGELADO									
LAVADO		TRANSFERENCIA					PALPACION		

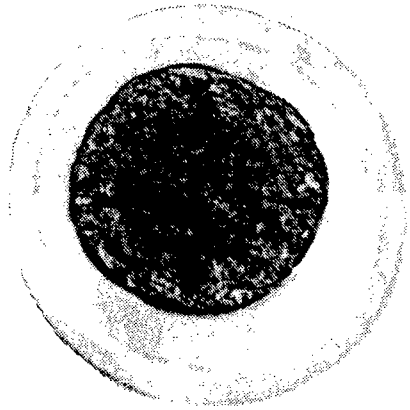


FOTO No 1. MC CALIDAD A-1 (AV)

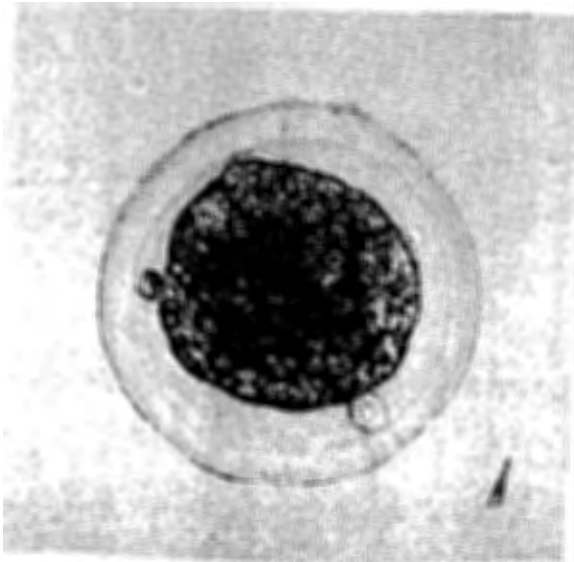


FOTO No 2. MC CALIDAD B-1 (AV)



FOTO No 3 BT CALIDAD A-1 (AV)

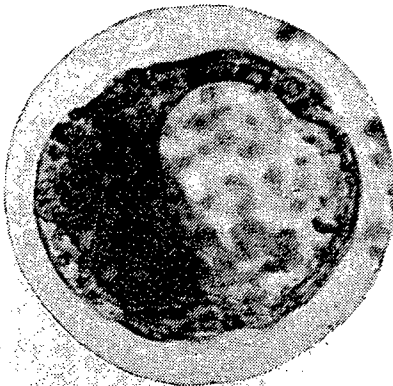


FOTO No 4 BT CALIDAD A-2 (PD)



FOTO No 5 BT CALIDAD A-1 (AV)



FOTO No 6 MC CALIDAD A-1 (AV)

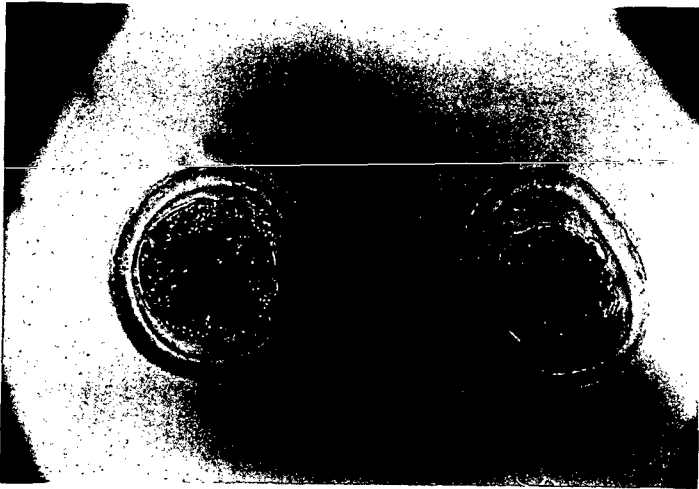


FOTO No 7 MC CALIDAD A-1 (PD)

El número total de embriones recuperados (conejas y vaca) para cada categoría, muestra una inclinación hacia MC con 16 calidad A-1 y 9 calidad A-2; seguida de BT con 4 calidad A-1 y 4 A-2, los BL sumaron 6 calidad A-1 y 1 A-2, mientras que las MNC son 5 calidad A-2 y 1 B-1. Finalmente para 8-16 E.J, fueron 5 calidad A-1.

El efecto de la vitrificación sobre la viabilidad post-descongelamiento en embriones de coneja, demuestra que los embriones con masa celular amplia y uniforme (MC y BT); son más recomendables para vitrificarlos con soluciones VS-1 y VS-2, y de resultados de viabilidad no muy altos para BL y 8-16 E.J. Resultados que no son equiparables con los mencionados por (6), (7).

Además, el grado de degeneración del embrión por efecto de la vitrificación; demuestran que las soluciones vitrificadoras no son efectivas para BL. Reportes de N. Saito lo confirman (11), y que la adición de azúcares, específicamente sucrosa y dextrosa a las soluciones aumentan la viabilidad en cualquier etapa del BL.

De la misma forma se demuestran las gestaciones a partir de MC y BT vitrificados con las soluciones mencionadas anteriormente; pero no se obtuvieron gestaciones de BL transferidos, resultados similares mencionan otros autores. (11).

Cuando se compara el grado de degeneración y porcentaje de gestación obtenido (28.57%) de los embriones vitrificados y transferidos; con los resultados que se obtienen (58-60% gestaciones) en transferencias que utilizan embriones manejados con diluciones conteniendo además de solución

vitrificadora; un azúcar (sucrosa) utilizada en el congelamiento. Para el descongelamiento es en 3 pasos, diluciones que contienen glicerol mas sucrosa en diferentes porcentajes. Se validan los resultados reportados por (11), y por técnicos de campo quiénes emplean dichas diluciones. Cabe señalar que dichos técnicos no realizan el vitrificado como en esta técnica en prueba, sino que; utilizan congelador programable y/o congelador manual y realizando el sembrado. Razón por la cual la curva de congelación en la técnica de vitrificado pudo afectar la viabilidad de los embriones por la probable formación de cristales intracelularmente. (12).

Otra variable observada en los embriones de vaca, es que al ser descongelados en VS-3 por 5 minutos; no recuperaron la forma esférica de su ZP, ni el volumen de la masa celular. Razón por la cual requirieron de mas tiempo (5 minutos más) para su hidratación. Solo la masa celular recupero su volumen, no así la Zp que permanecio igual.

La receptora número 48 de primer parto, transferida (primera transferencia) con embrión BL calidad A-1, se observó en la unión de la funda con la pajilla una pequeña gota de sangre después de haber depositado el embrión. Factor que influyo más que la calidad del embrión, para que no siguera su desarrollo y reptiera calor.

CONCLUSIONES

40

1.- Bajo las condiciones en las que se realizó el presente trabajo, se demostró que la técnica de vitrificación es una herramienta viable como apoyo a la criopreservación de embriones; tanto en conejas como en vacas.

2.- La técnica de vitrificación de embriones mostró porcentajes aceptables de no degeneración (coneja), y aunque aparentemente no fue muy alto el porcentaje de gestación en vacas (28.57%), estos resultados son alentadores para continuar la práctica de esta técnica; la cual ofrece ventajas sobre las utilizadas convencionalmente.

- 1.- Abas O. M., Valdez C.A., Takahashi Y., Hishinuma M. and Kanagawa H. : Quick freezing of mouse embryos using ethylene glycol with lactase or sucrose. *Animal reproduction Science*. 22: 161 - 169 (1990)
- 2.- Kasai M., Valdez C. A., Komi J. H., Takakamo A., Tsudera H., Sakurai T. and Machida T. : A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution. Without a preciable loss of viability. *J. Reproduction. Fert.* 89 : 91 - 97 (1990).
- 3.- Martin W., Canadiana Genetics Inc., *Manual de transferencia de embriones*, Pag. 45-46, 49-51., (1990).
- 4.- Nakagata N., High survival rate of unfertilized mouse oocytes after. *J. Reproduction. Fert.* 87 : 479 - 483. (1989).
- 5.- Rall W. F., : Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24 ; 387 - 402 (1987).
- 6.- Rall W. F., Wood M. J., Kirby C. and Whittingham D. S. : Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. fert.* 80 : 499 - 504 (1987).
- 7.- Rall W. F. and Fahy G. M.: Ice free Cryopreservation of mouse embryos at - 196 C by vitrification. *Nature. Lond.* : 313 : 573 - 575 (1985).
- 8.- Saito N., Imai K., and M.: Efect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *National Livestock Breeding Center*. Pag. 07-10 (1993).

- 9.- Scheffen B., P. Van Der Zwalmen., and Massip A. : A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo - Letters*. 7 : 260 - 269 (1986).
- 10.- Takahashi Y. and Kanagawa H., : Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen : Effects of Sugar. *Jpn. J. Vet. Res.*, 33: 141 - 144 (1985).
- 11.- Takahashi Y. and Kanagawa H. : Effect of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse morulae after rapid freezing. *Molecular Reproduction and development*. 26 : 105 - 110 (1990).
- 12.- Valdez C. A., Hishinuma M., Takahashi Y. and Kanagawa H. Effect of trealose dilution on the survival of vitrified-thawed mouse morulae. *Jpn. J. Vet. Res* 39: 23-26 (1991).
- 13.- Valdez C. A., Mazni A., Takahashi Y., Hishinuma M., and Kanagawa H. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 33: 627 - 636 (1990).
- 14.- Valdez C. A., Mazni A., Kanagawa H. and Fujikawa S. : Confirmation by cryo-electron microscopy of the absence of crystalization using a vitrification solution. *Crio-letter* 11: 351-358 (1990).
- 15.- Van Der P. Z., Gaurois B., Ectors F. J., Tovati A. and Ectors F. : Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology* 30 : 1177 - 1226 (1988).