

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES



CARRERA: MEDICINA VETERINARIA

TEMA:

EVALUACIÓN DE EMBRIONES A CONGELACIÓN LENTA Y VITRIFICACIÓN EN BOVINOS (BOS TAURUS) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Autores:

Diego Armando Esparza Álvarez

Edison Ricardo Parra Jiménez

Director:

MVZ. Cristian Neptalí Arcos Álvarez Mg

Latacunga – Ecuador

2015

AUTORIA

Nosotros , Diego Armando Esparza Álvarez Y Edison Ricardo Parra Jiménez, declaramos que el trabajo aquí descrito , la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de nuestra autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según establecido con la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

Diego Armando

Esparza Álvarez

C.I. 050351036-4

AUTOR

Edison Ricardo

Parra Jiménez

C.I. 050325849-3

AUTOR

AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Msc.

Enrique Estupiñán

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

Presente.-

De mi consideración.

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

En calidad de director de Tesis Titulada “ **EVALUACION DE EMBRIONES A CONGELACION LENTA Y VITRIFICACION EN BOBINOS (BOSTAURUS) EN LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI** ”. Propuesto por los egresados Diego Armando Esparza Álvarez Y Edison Ricardo Parra Jiménez, como requisito previo a la obtención del título de Médico Veterinario zootecnista, de acuerdo con el reglamento de títulos y grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Atentamente,

MVZ. Cristian Neptalí Arcos Álvarez
Director de Tesis



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

LATACUNGA – ECUADOR

CARTA DE APROBACION TRIBUNAL DE TESIS

En calidad de miembros del tribunal de grado aprueben el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi CAREN por cuanto, los postulantes con el tema de tesis "EVALUACIÓN DE EMBRIONES A CONGELACION LENTA Y VITRIFICACIÓN EN BOVINOS (BOS – TAURUS), Ha considerado la recomendaciones emitidas oportunamente y reúnen los méritos suficientes para ser sometidos al acto de defensa de tesis.

Por lo antes expuesto se autorice realizar los empastados correspondientes según la normativa constitucional.

Dr. MSC Enrique Estupiñan Rodríguez
Presidente del Tribunal

MVZ. Mg. Paola Jael Lascano Armas
Miembro Opositor

MVZ. Blanca Jeaneth Villavicencio Villavicencio
Miembro del Tribunal

www.utc.edu.ec

Av. Simón Rodríguez s/n Barrio El Ejido / San Felipe. Tel: (03) 2252346 - 2252307 - 2252205

AGRADECIMIENTO

Quiero extender un profundo agradecimiento a la Universidad Técnica de Cotopaxi por abrirme las puertas de esta noble Institución y me ha dado la oportunidad de continuar con mis estudios para superarme profesionalmente, a Dios por ser mi guía espiritual en todos los momentos de mi vida, a los docentes que con paciencia y sabiduría supieron encender en mí la luz de la sabiduría, a mis compañeros que con sus diferencias individuales me demostraron en todo momento actos de compañerismo, a mi familia que con su apoyo incondicional supieron orientarme por el camino del bien y ser una persona servicial a la sociedad.

DIEGO

AGRADECIMIENTO

Me gustaría agradecer el trabajo de tesis a Dios por bendecirme y hacer realidad mi sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI por abrirme las puertas para estudiar y ser un profesional a mis profesores quien me impartieron sus conocimientos, experiencias, paciencia y motivación para culminar mis estudios con éxito.

A mis padres, hermanos, mi hijo y mi esposa quienes son el pilar de mi motivación y desempeño diario para terminar mi carrera con gran satisfacción y orgullo tan anhelado en mi vida de hoy en adelante.

ÉDISON

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a mis padres, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mi madre, por ser el pilar fundamental siempre demostrándome su cariño y su apoyo incondicional. A mi padre, a pesar de nuestra distancia física, siempre he contado con su apoyo. A mi padrino Daniel, a quien quiero como un hermano, por compartir momentos trascendentales conmigo y por siempre estar dispuesto a escucharme y ayudarme en cualquier momento. A mis amigas, Kimberly, Mónica, Nicol, María Elena, Edison y Luis porque sin el equipo que formamos, no habiéramos logrado esta anhelada meta.

DIEGO

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de grado a Dios por darme la vida y una buena salud en la cual puedo culminar mis estudios.

Dedico a mis padres SEGUNDO PARRA y MARIETA JIMÉNEZ quienes estuvieron en los buenos y malos momentos de mi vida quien me apoyó económicamente y moralmente, a mis hermanos, hijo y esposa los que me apoyan moralmente para seguir luchando en mi carrera profesional y ética de hoy en adelante.

ÉDISON

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, nos corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

Diego Armando

Esparza Álvarez

C.I. 050351036-4

AUTOR

Edison Ricardo

Parra Jiménez

C.I. 050325849-3

AUTOR

INDICE

AUTORIA	i
AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
CARTA DE APROBACION TRIBUNAL DE TESIS	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTO	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
DEDICATORIA	vii
DECLARACIÓN EXPRESA	viii
INDICE	ix
INDICE DE GRAFICOS	xiii
INDICE DE TABLAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	xix
OBJETIVOS	xx
HIPOTESIS	xx
CAPITULO I	1
FUNDAMENTACIÓN TEORICA	1
Antecedentes	1
MARCO TEÓRICO	2
1.- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA	2
1.1. Órganos Genitales de la Vaca.	2
1.1.1. Genitales Externos.	3
1.1.1.1. Vestíbulo.	3
1.1.1.2. Vulva.	4
1.1.2. Órganos Genitales Internos.	4

1.1.2.1. <i>Vagina</i>	4
1.1.2.2. <i>Cervix</i>	5
1.1.2.3. <i>Útero</i>	6
1.1.2.4.- <i>Oviductos</i>	9
1.1.2.5.- <i>Ovarios</i>	12
1.2.- Ciclo Estral	14
1.2.1.- Etapas del ciclo estral	15
1.3.- <i>Fase Folicular</i>	16
1.4.- <i>Desarrollo Folicular</i>	17
1.5.- <i>Fase Lútea</i>	21
2.- PRODUCTOS MAYORMENTE UTILIZADOS PARA LA SUPEROVULACIÓN	23
2.1.- <i>Hormona Foliculo Estimulante (FSH)</i>	23
2.2.- <i>Follotropin</i>	23
2.3.- <i>Pluset</i>	23
2.4.- <i>Ovarigen</i>	23
2.5.- <i>Gonadotropina Corionica Equina (ECG)</i>	23
3.- PROCESO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	25
3.1.- Determinación de donantes y receptora	25
3.1.1.- <i>Donantes</i>	25
3.1.2.- <i>Receptoras</i>	25
4.-COLECCIÓN DE EMBRIONES	27
4.1.- <i>Recuperación por gravedad con circuito cerrado</i>	28
4.2.- <i>Recuperación por aspiración interrumpida</i>	29
5.1.- <i>Mórula o Estadio 4</i>	30
5.2.- <i>Mórula Compacta</i>	31
5.3.- <i>Blastocisto Temprano O Estadio 5</i>	31
5.4.- <i>Blastocisto O Estadio 6</i>	31
5.5.- <i>Blastocisto Expandido O Estadio 7</i>	31
5.6.- <i>Blastocisto Eclosionado</i>	31
6.-CALIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES	33
6.1.- Grados de Calidad	34
7.- CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONES BOVINOS	34
7.1.- Tipos de Criopreservación de Embriones Bovinos	35

7.1.1.- Congelación Convencional.	35
7.1.2.- Vitricación.	36
7.1.3.- Refrigeración.	37
7.1.3.- Crioprotectores.....	37
7.1.3.1.-De bajo peso molecular y permeables, como:.....	37
7.1.3.2.-De bajo peso molecular y no permeables como:.....	38
8.- PROTOCOLOS Y CURVA.....	38
8.1.-Exposición de los Embriones a las Soluciones de Congelación.	38
8.2.- Envasado de los Embriones.	39
8.3.-Enfriamiento Inicial.	39
8.4.-Inducción de la cristalización o "seeding".	40
8.5.-Descenso térmico lento y controlado.....	40
8.6.-Descenso térmico rápido.	40
8.7.-Almacenamiento en N₂ líquido.....	40
8.8.-Descongelación.....	41
8.9.-Extracción de los crioprotectores.....	41
CAPITULO II.....	42
MATERIALES Y METODOS.....	42
2.1. MATERIALES.....	42
2.1.1. Recurso Humano	42
2.1.2. Materiales De Oficina.....	42
2.1.3. Materiales De Laboratorio	43
2.1.3. Movilización.....	43
2.2. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DEL ENSAYO DE LA EVALUACIÓN DE LA SUPEROVULACIÓN EN LA HACIENDA “LA JIMENITA” PROVINCIA DE COTOPAXI, PARROQUIA ALAQUEZ.	44
2.2.1. Ubicación Política Geográfica De La Práctica	44
2.2.2. División Política Territorial.....	44
2.2.3. Situación Geográfica.	44
2.2.4. Condiciones Climáticas	45
2.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	46
2.3.1. Investigación Descriptiva.....	46
2.3.2. Investigación Exploratoria.....	46
2.3.3. Investigación No Experimental.....	47

2.4. METODOLOGÍA.....	47
2.4.1.- <i>Método Inductivo.....</i>	47
2.4.2.- <i>Método Deductivo</i>	47
2.5. MANEJO DEL ENSAYO.....	48
2.5.1. <i>Chequeo Ginecológico.....</i>	48
2.5.2. <i>Palpación Rectal Para La Determinación De Cuerpos Lúteos.....</i>	48
2.5.3. <i>Establecimiento Del Protocolo De Superovulación.....</i>	49
2.5.4.- <i>Lavado de Embriones.</i>	50
2.5.5.- <i>Determinación De Los Embriones Congelables Y No Congelables.</i>	50
2.6.- Vacas Donadoras.....	50
2.7.-Unidad Experimental.	50
2.8.-Distribución del Ensayo.	50
2.9.- Diseño Experimental.	51
2.10.- Descripción de los Tratamientos.....	51
2.11.- Operacionalización de las categorías fundamentales.	51
CAPITULO III	52
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
3.1 NÚMERO DE EMBRIONES COLECTADOS.....	52
3.2 CALIDAD DE EMBRIONES	54
3.3 CONGELACIÓN LENTA Y VITRIFICACION	55
3.4 POST-DESCONGELADO Y VITRIFICACIÓN	57
3.5. CONCLUSIONES.	58
3.6. RECOMENDACIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA	62
Citas del Internet.	63
Libros.	64
ANEXOS	65

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO 1 Representación de los pliegues de la vagina.	5
GRAFICO 2 Anillos cervicales formados por los pliegues internos en un plano transversal y el fornix del cérvix	6
GRAFICO 3 Cuerpo Uterino	9
GRAFICO 4 La Unión Utero-Tubal, el Istmo y el Ámpula son regiones del Oviducto.....	11
GRAFICO 5 Ovarios	13
GRAFICO 6 Ovario con un folículo dominante.....	21
GRAFICO 7 Identificación del desarrollo de los embriones.....	32
GRAFICO 8 Esquema de una pajuela plástica para cargar embriones	39
GRAFICO 9 Mapa de Ubicación de la parroquia Alaquez.	45
GRAFICO 10 Número de Embriones Colectados.....	53
GRAFICO 11 Calidad de los Embriones Colectados.....	54
GRAFICO 12 Distribución según la Calidad.....	56
GRAFICO 13 Evaluación postdescongelado y Desvitrificación.	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Etapas del ciclo estral y anestro.	15
Tabla 2 Protocolo de Superovulación Aplicado.	24
Tabla 3 Detección de Celo de la Donante	27
Tabla 4 Características Climáticas y Edafológicas	45
Tabla 5 Protocolo de superovulación con FOLLTROPIN-V	49
Tabla 6 Distribución del Ensayo.....	50
Tabla 7 Descripción de los Tratamientos	51
Tabla 8 Variables para la evaluación de los embriones bovinos en el laboratorio de biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.....	51
Tabla 9 Número de Embriones Colectados de cada Vaca	52
Tabla 10 Calidad de los Embriones Colectados.	54
Tabla 11 Distribución según la Calidad.	55
Tabla 12 Evaluación postdescongelado y Desvitrificación.....	57

RESUMEN

Este trabajo de investigación busca determinar el avance realizado en torno a los embriones Bovinos por congelación lenta y vitrificación en el laboratorio de biotecnología reproductiva de la Universidad, Estas técnicas han ido evolucionando en procedimientos de congelación más simples, prácticos y menos costosos, uno es la vitrificación de embriones, proceso de solidificación, en el cual se utiliza una solución altamente concentrada que no cristaliza durante el congelamiento, en tanto que su viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo semejante al vidrio. Para que los embriones soporten el choque osmótico, deben equilibrarse con una solución crioprotectora de menor concentración antes de exponerse a la solución vitrificante para su posterior congelación. Se ha publicado gran cantidad de técnicas de vitrificación para embriones, utilizando diferentes crioprotectores, concentración, volumen, método de adición, temperaturas, tiempo de exposición, tasa de congelación, descongelación y dilución, para mantener la función, estructura normal y viabilidad del embrión. Pero es importante, para observar el avance poner en práctica una Evaluación al proceso encaminado a producir embriones Bovinos por uno de los factores conocidos en la carrera de veterinaria , cómo es la congelación lenta, siendo imprescindible visualizar todo la planificación desde el momento que se aplica esta técnica, que permite conservar, y alargar el tiempo útil , de un embrión congelada para su utilidad y continuar con la reproducción asistida. Es importante conocer todo el aparato reproductor de la vaca, el tiempo, la disponibilidad en el cual está dispuesta el animal para realizar la transferencia del embrión, de manera eficiente, es aquí que se necesita que el profesional en veterinaria aplique adecuadamente el proceso de inseminación artificial, asistida, conociendo sobre todo los órganos reproductores de la vaca, dentro del proceso evaluación se requiere analizar también el procedimiento de vitrificación en torno al embrión, paso a paso, tomando en cuenta que es secuencial, continuo hasta lograr obtener los embriones, para luego ser

descongelados, de forma correcta evitando dañar la pajueta, existiendo los aspectos a determinar para aplicar el procedimiento para descongelar, para ello es importante trabajar con un solo embrión se haya vitrificado en pajilla abierta, además se aplicó la metodología adecuada para la obtención de los datos, poniendo en escena ciertas técnicas y métodos de la investigación para luego analizar los datos, para emitir la toma de decisiones y rectificar cuando algo este mal dentro del proceso de evaluación de los embriones.

Palabras Claves: Embriones, bovinos, Congelación lenta, Vitrificación, veterinaria, evaluación, pajueta, Biotecnología, laboratorio, reproducción.

ABSTRACT

This research aims to determine the progress made regarding bovine embryos by slow freezing and vitrification in the laboratory of reproductive biotechnology at the University, these techniques have evolved in procedures simpler, practical and less expensive freezing, one is vitrification, solidification process, in which a highly concentrated solution which does not crystallize during freezing is used, while the viscosity increases with decreasing temperature until the formation of an amorphous glass-like solid. For embryos withstand osmotic shock, to be balanced with a lower concentration cryoprotectant solution before exposure to the vitrification solution for further freeze. Has published many embryos vitrification procedures, using different cryoprotectants, concentration, volume, method of addition, temperature, exposure time, rate of freezing, thawing and dilution, to maintain the function, normal structure and embryo viability. But it is important to observe the progress implementing an evaluation process aimed at producing embryos Cattle by one of the known factors on the career of veterinary medicine, how slow freezing, being essential to visualize all the planning from the moment you apply this technique, preserving, and extend the useful time, a frozen for utility and continue with assisted reproduction embryo. It is important to know all the reproductive tract of the cow, the time availability in which the animal is ready for embryo transfer, efficiently, it is here that you need professional veterinary properly apply the insemination process artificial, power, knowing especially the reproductive organs of the cow, in the evaluation process must also analyze the procedure surrounding the embryo vitrification step by step, taking into account that is sequential, continuing to be able to obtain embryos for then they are thawed correctly avoiding damage to the straw, and there are aspects to determine the procedure for applying for defrosting, for it is important to work with a single embryo has been glazed open straw, plus the appropriate methodology for obtaining applied data, staging certain techniques and methods

of research and then analyze the data to issue decision's and making amends when something is wrong in the process of evaluation of the embryos.

WORDS: embryos, cattle, slow freezing, vitrification, veterinary, evaluation, straw, biotechnology, laboratory reproduction.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*, mediante los análisis de su morfología y nuclearidad posdescongelación, sometidos al método estándar (congelación lenta) y al de Vitricación.

Los primeros indicios de la transferencia de embriones la encontramos en 1890 con Walter Heape quien reporto el nacimiento de conejos en su laboratorio, como resultado de un trasplante de embriones. Luego en los años 30 y 40 trabajaron en la transferencia de embriones en bovinos y en 1951 nace el primer ternero en Wisconsin. Para 1977 ya se registraban publicaciones del tema. (Tribulo, H. 2008)

Dentro de los procesos de criopreservación existen diferentes factores que afectan la eficiencia del proceso y la supervivencia así como la viabilidad de los embriones, después de la congelación y descongelación, que se deben tener presentes antes de realizar el proceso; entre los factores más relevantes tenemos la calidad y el estado de desarrollo de los embriones. (Han M, Yamashina H, Koyama N, Lee K, Fukui Y, 2001)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de embriones a congelación lenta y vitrificación en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Aplicar un protocolo de superovulación y lavado de los embriones bovinos.
- Caracterizar la calidad de los embriones bovinos producidos in vivo a fin de identificar los embriones crioconservables.
- Evaluar la crioconservación de los embriones por la técnica de crioconservación lenta y vitrificación.

HIPOTESIS

HIPOTESIS ALTERNATIVA

HI.- se lograra la crioconservación de embriones producidos in vivo mediante crioconservación lenta y vitrificación.

HIPOTESIS NULA

HO.- No se logra crioconsevar embriones producidos in vivo con material de animales bovinos hembras vivas.

CAPITULO I

FUNDAMENTACIÓN TEORICA

El presente capítulo brinda información sobre las diferentes técnicas de criopreservación de embriones bovinos, analizando las ventajas y desventajas de cada una de ellas en lo que respecta a su realización, costos, instalaciones y porcentajes de preñez.

Antecedentes.

Tribulo, (2008) afirma “Que por los años de 1977, aparecen los primeros documentos, que hablan de las técnicas asistidas artificialmente, denominadas transferencias embrionarias, que en países Europeos, y en América de norte se comenzó a trabajar en este mecanismo, dentro de los laboratorios, para luego incrementar y buscar medios de preservación, de las pajuelas, por mucho más tiempo, utilizando la Vitrificación con hidrógeno para la conservación de las células reproductoras masculinas en este caso del toro” (pp.245).

La criopreservación es el proceso por el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente a la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido (-196°C), para disminuir las funciones vitales de una célula u organismo y poder mantenerlo en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. Esta técnica presenta ventajas biológicas y comerciales, permitiendo transportar embriones a cualquier lugar del planeta donde se encuentren las vacas receptoras; logrando muy buenos porcentajes de preñez que varían según la calidad del embrión y la técnica aplicada.

MARCO TEÓRICO

1.- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA

1.1. Órganos Genitales de la Vaca.

El aparato genital femenino es el órgano de reproducción de las hembras. Está capacitado para la producción de ovocitos y facilita su unión con los espermatozoides, así como el posterior alojamiento del embrión y el feto hasta el nacimiento. Para su estudio el aparato reproductivo de la hembra se ha clasificado en órganos genitales externos e internos (Gázquez y Blanco, 2004).

Dentro de las estructuras externas importantes está la vagina, conecta con la vulva formando un canal muy importante como receptáculo del pene durante el coito, así como al momento del parto para la expulsión del feto. Hacia el exterior se conecta con la vulva, constituida por dos labios y sus comisuras y el clítoris que se localiza dentro de ella. (Sisson *et al.*, 2005).

Los órganos genitales internos como el cérvix y el útero están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta del mesoovario, que sostiene al ovario; el mesosálpinx, que sostiene el oviducto; y el mesometrio, que sostiene al útero. En bovinos, la inserción del ligamento ancho es dorso lateral en la región del íleon, del modo que el útero está dispuesto como los cuernos de un carnero, con la convexidad dorsal y los ovarios situados cerca de la pelvis. (Hafez, 2005).

1.1.1. Genitales Externos.

El vestíbulo, los labios mayores, labios menores, el clítoris y las glándulas vestibulares constituyen los genitales externos.

1.1.1.1. Vestíbulo.

El vestíbulo de la vaca se extiende hacia el interior unos 10 cm, hasta el sitio donde el orificio uretral externo se abre en su superficie ventral. (Bearden hj. Fuquay J.,1982)

El vestíbulo de la vaca se extiende hasta el sitio donde el orificio uretral externo se abre en su superficie ventral. La pared del vestíbulo es similar a la de la zona posterior de la vagina, aunque existe mayor cantidad de tejido linfoide nodular en la zona superficial de la lámina propia-submucosa (Gázquez y Blanco, 2004).

En la pared vestibular existe gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, además de un laberinto de espacios cavernosos que se comportan como un tejido eréctil. En el tejido conectivo de la pared se pueden observar las denominadas glándulas vestibulares mayores y menores, que son glándulas túbulo alveolares mucosas (Gázquez y Blanco, 2004).

1.1.1.2. Vulva.

La Vulva es la apertura externa del aparato reproductor. Ella tiene tres funciones principales: dejar pasar la orina, abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto. Incluidos en la estructura vulvar están los labios y el clítoris. (Jarnette y Debel, 2001)

La vulva es la apertura externa del aparato reproductor; ella tiene dos funciones principales: abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto. Incluidos en la estructura vulvar están los labios y el clítoris. Los labios de la vulva están ubicados a los lados de la apertura vulvar, y tienen aspecto seco y arrugado cuando la vaca no está en celo. En la medida que el animal se acerque al celo, la vulva empezará a hincharse y tomará una apariencia rojiza y húmeda (Quintela *et al.*,2006)

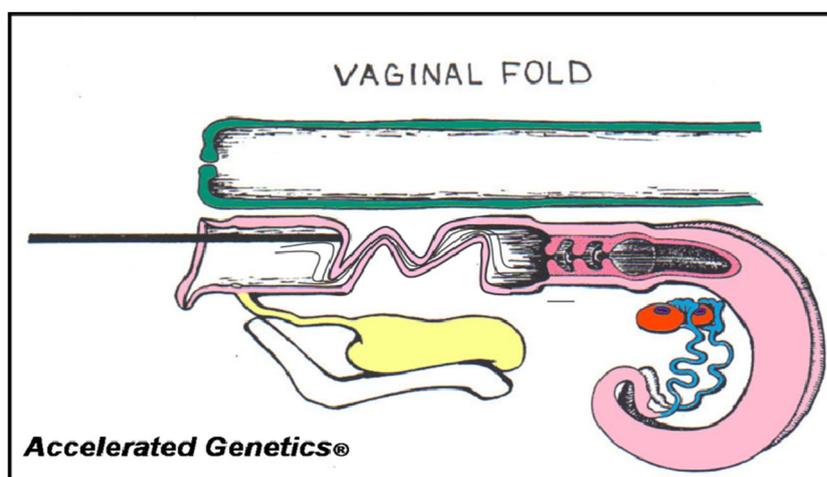
1.1.2. Órganos Genitales Internos.

1.1.2.1. Vagina.

La Vagina, que tiene como seis pulgadas de largo, se extiende desde la apertura uretral hasta la Cérvix. Durante la monta natural, el semen es depositado en la porción anterior de la Vagina. (Jarnette y Debel, 2001)

La vagina se extiende desde la apertura uretral hasta el cérvix. Durante la monta natural, el eyaculado es depositado en la porción anterior de la vagina. La vagina también sirve como parte del canal de parto (Sisson et al, 2005)

GRAFICO 1 Representación de los pliegues de la vagina.



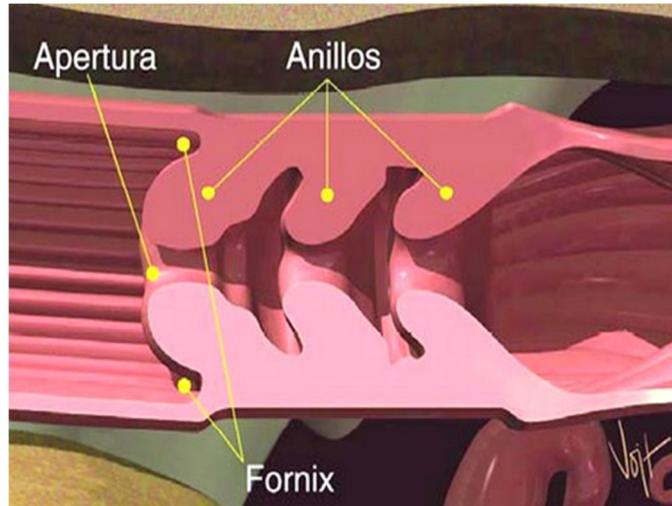
Fuente: Revisión anatómica del aparato reproductor de las vacas (Humberto Rivera M, MS 2009)

1.1.2.2. Cervix.

Es un órgano de paredes gruesas, que establece la conexión entre la vagina y el útero. Es un órgano fibroso formado predominantemente por tejido conectivo con pequeñas cantidades de tejido muscular liso. El cérvix o cuello uterino se caracteriza por una pared gruesa y una luz estrecha. Presenta varias prominencias que tiene la forma de bordes transversales alternados en espiral que se conocen como anillos cervicales (Quintela et al.,2006).

Esta estructura anatómica se encuentra perfectamente cerrada excepto durante el estro, cuando se relaja ligeramente y permite la entrada de espermatozoides al útero. La secreción mucosa del cuello uterino se expulsa por la vulva (Quintela et al.,2006).

GRAFICO 2 Anillos cervicales formados por los pliegues internos en un plano transversal y el fornix del cérvix



Fuente: http://www.selectsires.com/reproductive/reproductive_anatomy_spanish.pdf

1.1.2.3. Útero.

Craneal al cerviz, se encuentra el útero, envuelto en el ligamento ancho del útero que como mencionamos arriba le da gran movilidad. Compuesto por epitelio ciliar columnar, el útero es el lugar donde se lleva a cabo la gestación, es el responsable por brindar protección al feto y mantener una compleja comunicación entre la madre y el feto. (Publicado por IBETHK , 2012)

El útero consta de dos cuernos uterinos y un cuerpo. Tiene un tabique que separa los dos cuernos, y un cuerpo uterino prominente. Ambos lados del útero están unidos a las paredes pélvicas y abdominales por el ligamento ancho. Es el componente fundamental del aparato genital femenino que tiene como función el asentamiento e implantación del óvulo en caso de ser fecundado, aquí posteriormente se aloja el producto permitiendo el desarrollo del feto hasta el parto, momento en que ayuda con las contracciones a la expulsión del feto. (Sisson y Grossman, 1994).

Como órgano hueco, consta de tres capas: mucosa o endometrio, muscular o miometrio y serosa o perimetrio. Es el componente fundamental del aparato genital femenino que tiene como función el asentamiento e implantación del óvulo en caso de ser fecundado, así como el desarrollo de la placenta y el feto. (Gázquez y Blanco, 2004).

El endometrio representa la mucosa uterina y está constituida por un revestimiento epitelial cúbico puesto que la altura de las células epiteliales está influida por el estado hormonal de la hembra a lo largo del ciclo ovárico. El endometrio está sometido a cambios estructurales durante el ciclo sexual, de tal manera que en los rumiantes se edematiza al llenarse los espacios alveolares conectivos de fluido plasmático proveniente de la abundante vascularización. (Gázquez y Blanco, 2004).

En las hembras bovinas gestantes se pueden observar las carúnculas, que consisten en engrosamientos delimitados del endometrio por los que se produce la unión de la placenta materna con la placenta fetal, en la que no existen glándulas endometriales (Gázquez y Blanco, 2004).

El miometrio está constituido por dos capas de músculo liso: la interna es circular y muy gruesa y la externa longitudinal y más fina. El músculo del miometrio aumenta considerablemente durante la gestación. En el límite entre las dos capas se encuentra gran cantidad de vasos sanguíneos grandes que también irrigan al endometrio, muy abundantes en las regiones carunculares de las hembras gestantes bovinas (Perez y Romano, 1996).

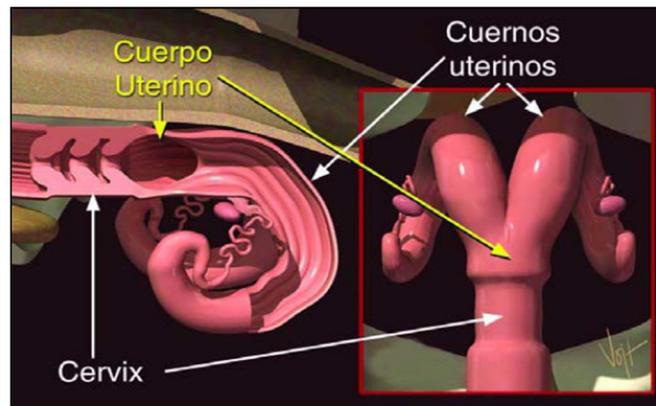
El perimetrio, o túnica serosa está formado por tejido conectivo laxo, recubierto por un mesotelio, que alberga fibras musculares lisas y gran cantidad de vasos

sanguíneos, vasos linfáticos y nervios, cuyas funciones principales radican en facilitar contracciones al momento del parto, así como contener el sistema de irrigación para dotar de nutrientes a los diferentes tejidos (Pérez y Romano, 1996).

En los tejidos del útero se producen algunas secreciones que son responsables de propiciar las condiciones apropiadas que permitan la supervivencia y capacitación de los espermatozoides para la fecundación del ovulo. Así mismo, para facilitar la división del blastocisto temprano antes de la implantación. El volumen, la composición bioquímica del líquido uterino tienen diferentes variaciones que se ajustan a las diferentes etapas del ciclo estral. El endometrio además de las funciones de sostén produce diferentes sustancias llamadas genéricamente —líquido endometrial, que está contenido principalmente por proteínas séricas y algunas otras más específicas como 25 factores de crecimiento y factores inmuno - inhibidores, cuya responsabilidad es facilitar el crecimiento embrionario (Hafez, 2005).

El útero presenta una serie de contracciones que se coordinan con la motilidad del oviducto y ovario. El origen, dirección, amplitud y frecuencia de las contracciones en el tracto reproductivo varía considerablemente a lo largo del periodo gestacional. Pero la respuesta contráctil del útero permanece latente hasta el momento del parto, en que realiza su cometido principal en la expulsión del feto. Después del parto, el útero recupera su tamaño y condición previos por un proceso llamado involución, que dura de 30 a 40 días (Hafez, 2005).

GRAFICO 3 Cuerpo Uterino



Fuente:

http://www.selectsires.com/reproductive/reproductive_anatomy_spanish.pdf

1.1.2.4.- Oviductos.

Con un tamaño de 7 pulgadas de largo y $\frac{1}{4}$ de pulgada de ancho cada oviducto (derecho e izquierdo) se convierte en la estructura que une los cuernos uterinos con el ovario, además de ser el sitio donde se lleva a cabo la fertilización. El extremo craneal del oviducto presenta una abertura ancha y delgada en forma de embudo llamada *fimbria* la cual abraza el ovario y captura el óvulo durante la ovulación. (H. Rivera M, MS. 2009)

Existe una íntima relación entre el ovario y el oviducto. En bovinos, el ovario se encuentra en una bolsa ovárica abierta, que consiste en un delgado pliegue peritoneal del mesosálpinx, que está unido a un asa suspendida en la porción superior del oviducto, en bovinos, la bolsa ovárica es ancha y abierta (Hafez, 2005).

El oviducto, puede dividirse en cuatro segmentos funcionales: las fimbrias, en forma de olas, el infundíbulo, abertura abdominal en forma de embudo cerca del

ovario; el ámpula, dilatada y más distal, y el istmo, la porción proximal estrecha del oviducto, que conecta a este con la luz uterina (Sisson, 1994).

La porción más alta del oviducto, cercana al ovario, es llamada ámpula, es en este segmento del oviducto en el que ocurre la fertilización. La estructura en forma de embudo al final del oviducto, llamada infundíbulo, rodea los ovarios y almacena los óvulos, evitando que estos caigan a la cavidad abdominal. Las estructuras vellosas sobre el infundíbulo y dentro de la ámpula, se mueven rítmicamente para transportar el óvulo a través del oviducto al sitio de la fertilización (Quintela *et al*, 2006)

La mucosa del oviducto está constituida por pliegues primarios, secundarios y terciarios. La del ámpula está dispuesta en pliegues elevados y ramificados cuya altura disminuye hacia el istmo y que se convierten en bordes bajos en la unión uterotubárica, donde se unen el oviducto y el cuerno uterino correspondiente. La compleja configuración de estos pliegues mucosos en el ámpula llena casi por completo la luz (Gázquez y Blanco, 2004)

En la mucosa del oviducto, las células ciliadas cuentan con cilios móviles, llamados cinocilios, que se extienden hacia la luz. La rapidez con que estos cilios se mueven es influida por la concentración de hormonas ováricas; su actividad es máxima durante la ovulación o poco después, cuando el movimiento de los cilios de la parte fimbriada de los oviductos está muy sincronizado y dirigido hacia la abertura del infundíbulo. La acción del movimiento ciliar permite que el ovulo se desprenda de la superficie de los folículos colapsados hacia el agujero del oviducto. Los cilios se mueven hacia el útero. Su actividad, acoplada a las contracciones del oviducto, mantienen a los óvulos en constante rotación, lo que es esencial para reunir ovulo y espermatozoide e impedir la implantación en el oviducto. Los oviductos se atrofian y pierden los cilios durante el anestro, se

hipertrofian y recuperan los cilios durante proestro y estro, y vuelven a atrofiarse y a perder los cilios durante la preñez (Benesch, 1951)

Las células secretorias de la mucosa del oviducto son no ciliadas y característicamente contienen gránulos secretorios. El líquido de los oviductos está constituido por un contenido selectivo de sueros y productos de secreción de los gránulos de las células secretorias del epitelio oviductal. El líquido de los oviductos tiene varias funciones, incluidas la capacitación e hiperactivación del espermatozoide, fecundación y el desarrollo embrionario temprano previo a la implantación (Gázquez y Blanco, 2004)

Las contracciones de los oviductos facilitan la mezcla de su contenido, ayudan a desnudar el ovulo, facilitan la fecundación al incrementar el contacto entre espermatozoides y ovulo (Hafez, 2005).

GRAFICO 4 La Unión Utero-Tubal, el Istmo y el Ámpula son regiones del Oviducto



Fuente: http://www.selectsires.com/reproductive/reproductive_anatomy_spanish.pdf

1.1.2.5.- Ovarios.

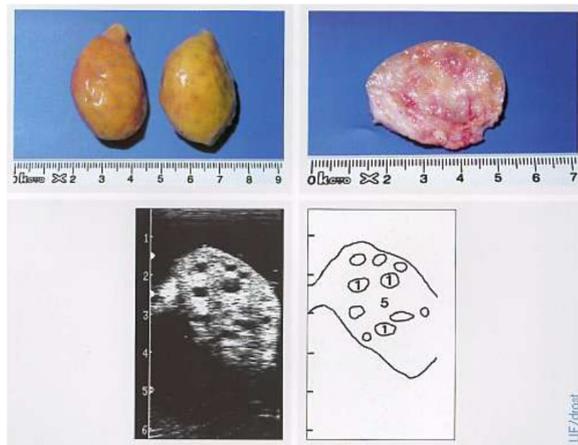
Los ovarios son quizás los órganos más importantes del aparato reproductor de la hembra, ya que ellos se producen los óvulos (función exocrina) y las hormonas (función endocrina). (Jarnette M. Y Debel R, 2001)

Los ovarios de la vaca miden normalmente de 3.5 a 4 cm de longitud, 2.5 cm de ancho y tienen alrededor de 1.5 cm de grueso en su porción mayor, el peso es de 15 a 20 g.). En bovinos y ovinos, el ovario tiene forma de almendra. (Sisson y Grossman, 1994)

El ovario se constituye como un cuerpo ovoide en el que es posible distinguir una zona gruesa periférica, o corteza, y una zona interna o médula. La corteza está recubierta por una lámina continua de epitelio denominado epitelio germinal que cuando alcanza el hilio ovárico se continúa con el mesotelio del repliegue peritoneal. Debajo del epitelio germinal hay una capa de tejido conectivo fibroso denominado túnica albugínea. La medula es la zona central del ovario, compuesta por tejido conectivo laxo con fibras musculares lisas y abundante inervación y vascularización. Los vasos sanguíneos de esta zona son muy tortuosos y de gran tamaño (Gázquez y Blanco, 2004).

El ovario, a diferencia del testículo, permanece en la cavidad abdominal. Realiza tanto funciones exocrinas (liberación de óvulos) como endocrinas (esteroidegénesis). El ovario no funciona como una glándula de secreción interna, pero contiene el patrimonio genético, consistente en varios miles de folículos primordiales.

GRAFICO 5 Ovarios



Ovarios Inactivos durante anestro (20 x 15 x 15 mm). Pieterse MC (1999)

Los ovarios, sometidos a la influencia y control de las hormonas gonadotropinas hipofisarias, son los responsables del ciclo estral de la hembra. Los ovarios son además responsables del crecimiento y maduración de las células sexuales femeninas, denominadas óvulos. La función endocrina de los ovarios es la de producir hormonas sexuales denominadas estrógenos, necesarias para acondicionar el aparato reproductor para la recepción del macho y un acondicionamiento favorable para la fecundación del óvulo. Los estrógenos promueven y mantienen los caracteres sexuales secundarios. Son capaces de desarrollar una glándula endocrina temporal denominada *corpus luteum*, (cuerpo lúteo) que secreta la hormona progesterona, responsable de preparar al endometrio para la implantación y nutrición del cigoto (Squires, 2003).

Las hormonas ováricas son producidas por dos estructuras cíclicas, folículo y cuerpo lúteo, responsables de todas las modificaciones del aparato genital femenino que se producen durante el ciclo estral. Los elementos cíclicos ováricos tienen una vida breve, contenida complejamente en el arco del ciclo estral. En cada ciclo se forma, indiferentemente en el ovario derecho o izquierdo, un folículo del cual deriva un cuerpo lúteo, continuando de esta forma durante toda la vida

sexual si no aparecen gestaciones o factores patológicos. Los dos ovarios son interdependientes y funcionan al unísono como si se tratase de un único órgano. (Quintela *et al*, 2006)

1.2.- Ciclo Estral.

Se puntualiza la dinámica folicular y el desarrollo de ondas en cada ciclo estral y la endocrinología y características del desarrollo folicular durante el ciclo estral bovino.

El ciclo estral representa un patrón cíclico de actividad ovárica que permite a las hembras ir de un periodo reproductivo de no receptividad a uno de receptividad

Permitiendo establecer el apareamiento y el subsecuente establecimiento de la gestación (Forde *et al*, 2011).

El inicio del ciclo estral ocurre al momento de la pubertad, en donde la hembra bovina entra a un periodo de ciclicidad reproductiva que continua a través de toda su vida, a excepción del periodo de gestación o de balance energético negativo en el cual prevalece el anestro (revisado por Sartori y Barros, 2011).

1.2.1.- Etapas del ciclo estral.

Tabla 1 Etapas del ciclo estral y anestro.

ETAPA DEL CICLO ESTRAL Y ANESTRO	DURACIÓN Y HALLASGOS
Diestro	<p>Dura de once 11 a 15 días</p> <p>Cuerpo lúteo funcional (Tamaño variable),Útero normal (flácido)</p> <p>Folículos de 4 a 10 mm (normalmente solo se detecta el dominante)</p>
Proestro	<p>Dura de 3 a 4 días</p> <p>Cuerpo lúteo en regresión, más pequeño y se siente más compacto, Útero edematoso, Folículo dominante mayor a 10 mm</p>
Estro	<p>Dura entre 6 a 24 horas</p> <p>Receptividad sexual (celo o calor), Turgencia uterina</p> <p>Difícil detectar estructuras lúteas, Folículo ovulatorio > 10 mm (frágil), Presencia de moco al palpar</p>
Metaestro	<p>Dura entre 3 y 4 días</p> <p>Ovulación ,Útero edematoso al inicio y flácido al final</p> <p>Dificultad para palpar estructuras ováricas (cuerpo hemorrágico), Regresión del CL anterior e inicio del crecimiento del siguiente , Folículos < 10 mm , Moco sanguinolento</p>
Diestro	<p>Duración Variable, Depende de fin zootécnico, Útero normal ,Ausencia de estructuras lúteas ,Folículos entre 4 y 10 mm.</p>

Fuente: Características del tracto reproductor en vacas no gestante durante el ciclo estral. (Calderón 2011)

1.3.- Fase Folicular.

Los folículos ováricos son las unidades básicas de la biología reproductiva femenina. Consisten en una acumulación de células haploides que son toscamente esféricas que se encuentran en el interior del ovario, rodeando un ovocito (Quintela et al.,2006).

Estas estructuras se activan periódicamente e inician el proceso de crecimiento y desarrollo para culminar, generalmente, en la ovulación de un solo ovocito viable. Estos ovocitos son envueltos por una capa de células granuladas encerradas en una matriz extracelular —la membrana folicular principal o lámina basal— que constituye el folículo ovárico. Los folículos ováricos con mayor crecimiento que son visibles a simple vista son a menudo llamados folículos de Graaf (en honor de Regnier de Graaf) (Squires, 2003).

Desde el nacimiento, algunos de ellos inician el desarrollo en sucesión hasta convertirse en folículos cavitarios de 10 mm de diámetro, después sufren una regresión y desaparecen sin dejar rastro (Calderón, 2011) Al nacimiento una capa de células foliculares rodea los oocitos primarios en el ovario para formar los folículos primordiales (Gázquez y Blanco, 2004).

El proceso de maduración del folículo se denomina foliculogénesis. Una vez el folículo ovárico se ha desarrollado, ejerce las siguientes funciones básicas: Mantiene, nutre y madura al ovocito y lo libera en el momento adecuado. Proporciona sostén hormonal al feto hasta que la placenta pueda asumir esta función. Una vez que el ovocito es expulsado del ovario recibe el nombre de óvulo. Esta fase da inicio al ciclo estral y abarca dos periodos: el proestro que dura de 2 a 4 días y el estro cuya duración varía de 12 a 18 horas, mientras que durante el proestro se sucede el crecimiento de una onda folicular ovulatoria y un ovocito dominante. El periodo del estro es la única fase en la cual la vaca presenta cambios observables en su conducta y el único momento durante el ciclo en el

cual acepta la estimulación del toro y la monta. Solo se puede visualizar el estro durante 8 a 12 horas, y en casos excepcionales, hasta 18 horas (menos de un día) (Eli, 2005).

Esta fase es de corta duración, pero de gran importancia para la reproducción. Durante el proestro, un folículo de Graaf inicia su crecimiento final que lo va a llevar en forma normal a la ovulación, en este folículo se establece una gran secreción de estrógenos, los cuales poco a poco van produciendo los signos del estro o celo. Estos estimulan cambios en el comportamiento en los machos como respuesta ferohomónica y coinciden con la fase de aceptación de la hembra hacia el macho. Como consecuencia se sucede la cópula, monta o servicio, característica de esta fase. Además, los estrógenos estimulan internamente al hipotálamo (en el sistema nervioso central) al producir la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que a su vez va a estimular a la hipófisis anterior para descargar la hormona luteinizante⁷ (LH) responsable de la ovulación del folículo después de terminado el celo (metaestro) y de liberar un ovocito que al unirse con un espermatozoide (fecundación) será el punto de partida de la preñez (Eli, 2005).

1.4.- Desarrollo Folicular.

Al nacimiento, los ovarios en mamíferos contienen gran cantidad de folículos primarios (cerca de 500,000 en vacas) que gradualmente crecen y maduran a medida que el animal madura. Estos folículos primarios consisten en un ovocito rodeado de una capa simple de células granulosas y tejido intersticial, capaz de mantener al óvulo suspendido en la primera etapa de la división meiótica . Conforme el folículo crece , el ovocito aumenta en diámetro y es rodeado por la zona pelúcida. (Gazquez y Blanco, 2004)

Los ovocitos o células germinales femeninas están incluidos en el tejido conjuntivo laxo de la corteza, por debajo de la capa o túnica albugínea. Cuanto más joven es la hembra, mayor cantidad de ovocitos tiene, ya que nace con todos los ovocitos que va a poseer durante toda su vida. En cada ciclo sexual, un pequeño número de ovocitos, entre 5 y 30, dependiendo de la especie, evolucionan hacia folículos para ser expulsados. No obstante, solo un reducido número concluye el desarrollo y son expulsados del parénquima ovárico. Los otros quedan detenidos en diferentes fases de desarrollo y degeneran por un proceso de atresia folicular. El número de folículos disminuye progresivamente a lo largo de la vida, y en la fase última de inactividad ovárica son casi imposibles de distinguir, aunque algunos pueden persistir. La gran mayoría de los folículos sufren atresia después de la maduración, ya que solo un limitado número de ovulaciones ocurren (una vaca ovula un promedio de 300 folículos en un periodo de 15 años). El crecimiento de folículos hasta 3 mm en diámetro es independiente de FSH, mientras que FSH es requerida para el crecimiento de los folículos de 3 a 10 mm en diámetro (Driancourt, 2001).

Los ovocitos se localizan mayoritariamente en la corteza y se distribuyen de forma homogénea por toda la corteza. A medida que van madurando los folículos ováricos se acercan a la medula, donde existe una mayor vascularización, sin embargo, cuando van a ser expulsados del ovario, tienden a aproximarse de nuevo a la zona cortical (Driancourt, 2001).

El folículo primordial es a primera fase de la evolución folicular del ovocito y está integrado por un ovocito recubierto por una capa única de células foliculares planas, que se establecen como un epitelio simple plano rodeado por una nítida membrana basal. En conjunto, el folículo primordial llega a medir aproximadamente 40 nanómetros de diámetro (Squires, 2003).

El ovocito integrante del folículo primordial mide unos 20 nanómetros de diámetro. Tiene un núcleo esférico vesiculoso y de gran tamaño, de situación excéntrica con respecto al citoplasma y un nucléolo muy desarrollado. Este tipo de folículo se puede catalogar como folículo en reposo. El paso de un folículo primordial en desarrollo a un folículo primario en desarrollo implica una serie de cambios en el ovocito, en el epitelio folicular y en el tejido conectivo que lo rodea.

El inicio del desarrollo viene marcado por un aumento del tamaño del ovocito acompañado por la transformación de las células epiteliales foliculares desde su forma plana a células cúbicas. Se sigue de una gran actividad mitótica del epitelio folicular que se transforma en un epitelio estratificado de células que reciben el nombre de células de la granulosa. La lamina basal que recubría el folículo aumenta de grosor y se convierte en la lámina limitante externa del folículo (Driancourt, 2001).

En el ovocito ocurren una serie de cambios tanto en tamaño y número como en la distribución de los orgánulos. En el límite entre el ovocito y las células de granulosa se desarrolla un espacio en el que se proyectan las microvellosidades del ovocito y las células de la granulosa, este espacio se denomina zona pelúcida. Otro cambio notable ocurre en las células de la teca, que se diferencian en dos zonas: una interna muy vascularizada y adosada al folículo (teca interna, cuyas células son de carácter secretor), y una externa, constituida principalmente por tejido conectivo (teca externa) (Gázquez y Blanco, 2004).

En la zona de la granulosa, las células inician la secreción de líquido folicular que es vertido a unas cavidades que forman ellas mismas a la vez que se desarrollan los canales intercelulares de la granulosa. En este instante de producción folicular se inicia la fase de folículo secundario. Los espacios intercelulares aumentan

tanto en número como en tamaño, dando lugar al antro folicular o folículo antral (Diskin y Sreenan, 2000).

Las células de la granulosa próximas al ovocito constituyen el cúmulo ooforus u ovígero, una prominencia en el interior de la cavidad folicular, donde se formará la corona radiada, que consiste en un grupo de células granulosas dispuestas alrededor de ovocito. Una vez que se formó la corona radiada, entre las células del cúmulo ooforus se relajan los espacios intercelulares de forma que el ovocito, junto con la zona pelúcida y la corona radiada se separan y se integran al interior del antro, constituyéndose el folículo terciario o de Graaf, que consiste en el folículo dispuesto para la ovulación (Diskin y Sreenan, 2000).

Las gonadotropinas juegan diferentes roles, incluyendo el control y desarrollo de los folículos ováricos, la ovulación y la formación y función del cuerpo lúteo, así como la regulación de la producción de hormonas gonadales (Squires, 2003)

Las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH) que son liberadas en la pituitaria anterior juegan un papel fundamental en la formación y maduración de folículos. La liberación de hormonas gonadotrópicas es facilitada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo. La GnRH es enviada a la pituitaria anterior o hipófisis, a través de los vasos del conducto hipotalámico-hipofiseal. Tanto GnRH, como las gonadotropinas son liberadas en forma pulsátil, y la frecuencia y amplitud de estos pulsos afectan de manera importante las funciones biológicas (Diskin y Sreenan, 2000).

Las variaciones en la liberación pulsátil de GnRH tienen un efecto diferencial sobre la producción de LH y FSH. Muchos factores externos afectan la actividad generadora de pulsos en el sistema nervioso central y por lo tanto inciden en las

actividades del sistema reproductivo. Estos factores incluyen nutrición, estrés, amamantamiento, presencia del macho, estación del año y claves visuales y olfatorias.

La inhibina, la activina y la folistatina (proteína ligadora de activina) son producidas por las gónadas y regulan la liberación de FSH por la pituitaria. La inhibina reduce la producción de FSH, mientras que la activina estimula su producción independientemente de GnRH. Las folistatinas pertenecen a una familia de glicoproteínas monoméricas que se unen a activina y previenen el estímulo para la producción de FSH (Squires, 2003).

GRAFICO 6 Ovario con un folículo dominante



Fuente: Ovario con un folículo dominante.(Loeza, 2011)

1.5.- Fase Lútea.

La fase lútea o del cuerpo lúteo (CL) del ciclo abarca dos periodos: metaestro y diestro. El metaestro dura de 2 a 3 días y se caracteriza por ser el momento en el cual sucede la ovulación, mientras que el diestro es la fase más larga del ciclo (13 a 15 días). En el mismo lugar en donde se produjo la ovulación se va a desarrollar un nuevo elemento glandular llamado cuerpo lúteo. De los 21 días del ciclo, la

fase lútea abarca de 15 a 18 días. Después de la ovulación, las células de la teca degeneran mientras que las de la granulosa sufren hipertrofia y se luteinizan a través de las células de luteina. Estas células producen progesterona, la cual inhibe la secreción de GnRH del hipotálamo y por lo tanto disminuye la secreción pulsátil de LH. El CL se desarrolla rápidamente y la producción de progesterona se incrementa al inicio del ciclo (días 3 a 12 en la vaca) y se mantiene constante hasta el día 15 a 16, cuando la regresión (luteólisis) se inicia a menos que la fertilización ocurra. La presencia de un CL funcional durante la fase luteal evita la ovulación, y que ningún folículo que madure durante la fase luteal inicie la atresia (Driancourt, 2001).

Los estrógenos actúan en el útero incrementando los receptores para estrógenos y oxitocina. Si la fertilización e implantación no ocurren, niveles altos de progesterona y oxitocina del ovario estimularán al útero a secretar prostaglandinas $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), que provoca regresión del CL al interferir la acción de LH sobre el CL e incrementar la producción de oxitocina por el ovario. Una nueva fase folicular entonces se inicia conforme el folículo madura hasta su ovulación (Wiltbank, 2000).

En la ausencia de gestación, la hembra madura pasa por una serie de ciclos reproductivos continuos, dentro de los cuales un grupo de folículos ováricos maduros (fase folicular), hacen que la hembra se manifieste receptiva a la monta (estro o calor), y el folículo dominante ovula y es formado un cuerpo lúteo (CL), lo que da inicio a la fase lútea. El número de folículos ovulados y el CL formado es una característica de especies y algunas veces hasta de razas dentro de una especie. Si la fertilización del huevo y la implantación del embrión no ocurre, el CL regresa (luteólisis) y el ciclo se repite. (Hafez, 2005.)

2.- PRODUCTOS MAYORMENTE UTILIZADOS PARA LA SUPEROVULACIÓN.

2.1.- Hormona Foliculo Estimulante (FSH).

Era un extracto de pituitaria de animales domésticos que se encontraba en el mercado hasta unos años hacia atrás. Debido a que es un extracto no purificado contenía cantidades muy variables de FSH y LH con diferencias significativas entre las partidas.

2.2.-Follotropin.

Es un extracto pituitario porcino al que se a extraído aproximadamente el 80% de la LH.

2.3.-Pluset.

Es un extracto pituitario porcino con iguales cantidades de FSH y LH.

2.4.-Ovarigen.

Es un extracto pituitario ovino purificado con muy poca LH. Cada frasco de 20ml contiene 17,6 mg NIADDK o FSH 17 de FSH ovina.

2.5.- Gonadotrofina Corionica Equina (ECG).

Es una glicoproteína compleja con actividad FSH y LH.

Tiene una vida media de 40 horas en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea. Por esta razón normalmente se administra una sola dosis I.M. seguida por PGF 48 horas después.

2.6.- Gonadotropina Menopáusica Humana (HMG).

Esta hormona tiene la misma cantidad de FSH que de LH y los tratamientos consisten en aplicaciones I.M. cada 12 horas en dosis decrecientes por 4 o 5 días. (Tribulo, H. 2008)

Tabla 2 Protocolo de Superovulación Aplicado.

Día 0	Detección del celo de la donante
Día 10 am	Comienzo del tratamiento con gonadotrofinas a las donantes
Día 11 mediodía	Inyección de PGF en las receptoras
Día 12 am	Inyección de PGF donantes
Día 14 am	Celo de donante y receptoras
Pm	Primera IA
Día 15 am	Segunda IA
Día 21	Colección y transferencia o congelado de embriones

Fuente (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

3.- PROCESO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

3.1.- Determinación de donantes y receptora

3.1.1.-Donantes

Desean obtener el máximo de rendimiento de las mejores vacas, por lo tanto es seguro en la selección para utilizarlas como donadoras se utilizan semen de excelentes toros mejoradores y se obtendrán embriones de estupenda clase.

Descanso post parto de 60 días o más buen manifiesto reproductivo al ciclar cada 18 – 21 días resultados negativos a las enfermedades reproductivas (Ramirez, F. 2010).

El productor tiene sus propias razones para la selección de sus donantes, las cuales son a menudo más económicas en genética reducen costos la selección de la vaca donante es un evento crítico del cual depende el éxito del programa.

- Criterios generales para la selección de donantes son los siguientes:
- Ciclos estrales regulares y que hayan comenzado a temprana edad.
- Ningún problema al parto o irregularidades reproductivas.
- Ningún defecto genético o de conformación detectable.
- Historia de buena respuesta en superovulaciones anteriores.(Tribulo, H. 2008)

3.1.2.-Receptoras

Desde el punto de vista reproductivo una buena receptora es la hembra capaz de recibir un embrión y llevarlo a término. Más aún, la receptora deberá ser capaz de

parir sin grandes dificultades y luego alimentar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético.

El tamaño de la receptora dependerá del tipo de animal (embrión) que se transferirá. De acuerdo con las tendencias actuales, particularmente en las razas para carne, se busca un gran tamaño de ternero con pesos al nacimiento de 40 ó 50 kg y aún más. Por lo tanto, no se deben tener dudas de elegir hembras de gran tamaño.

La edad de la receptora es un aspecto importante en el cual sin embargo, no hay coincidencias entre autores. (Palma, G. 2001)

Debe ser un animal con buen comportamiento reproductivo, pues debe tener ciclos regulares cada 18- 21 días, debe estar negativa a las enfermedades reproductivas como brucelosis, trichomoniasis, etc.

Debe tener un buen tamaño y amplitud pélvica y un útero con más de 60 días de descanso después del parto, buen estado nutricional y satisfactorio. (Ramírez, F. 2010).

Tabla 3 Detección de Celo de la Donante

Día 0	Detección del celo de la donante
Día 10 am	Comienzo del tratamiento con gonadotrofinas a las donantes
Día 11 mediodía	Inyección de PGF en las receptoras
Día 12 am	Inyección de PGF donantes
Día 14 am	Celo de donante y receptoras
pm	Primera IA
Día 15 am	Segunda IA
Día 21	Colección y transferencia o congelado de embriones

Fuente: Esquema tradicional de tratamiento de superovulación en bovinos

(Tribulo, H. 2008)

4.-COLECCIÓN DE EMBRIONES.

Las técnicas de colección de embriones consisten en el lavado interno de los cuernos uterinos y de acuerdo al procedimiento utilizado. A su vez se pueden utilizar el método de Gravedad o Continuo o el de Aspiración o Jeringa. (Tribulo, H. 2008)

4.1.- Recuperación por gravedad con circuito cerrado.

Se usa un catéter de dos vías generalmente de 18-20G (French). Se coloca aproximadamente 1 litro de medio de lavado en un frasco que se une al Foley a través de un tubo de 50 cm de largo. La unión entre el Foley y el tubo se realiza a través de un colector en forma de T. El extremo libre de la T se une al tubo de salida que va a desembocar en el frasco de colección.

Para tener una idea del tamaño del cuerno una vez llenado se dice que el cuerno de una vaquillona se distiende a un tamaño aproximado de una preñez de 35 días y el cuerno de una vaca se distiende a un tamaño de preñez de 45 días. Una vez que no entra más medio de lavado al cuerno se cierra el tubo de entrada y se masajea de manera que el medio lave todo el cuerno. Luego se abre el tubo de salida y se colecta el medio por gravedad en un frasco estéril de vidrio. Si aun quedara medio de lavado en el cuerno, éste debe masajearse suavemente para facilitar su salida.

Una vez que se recupera la primera entrada de medio de lavado se repite el proceso hasta que se haya utilizado 500 a 800 ml de medio. El útero se va expandiendo con cada lavado cada vez más y más (especialmente en vacas multíparas) lo que permite "soltar" los embriones que se encuentran en los pliegues de la mucosa. La temperatura del medio no es crítica, pero los shocks térmicos deben evitarse.

Cuando termina la colección; el balón del catéter es desinflado y el catéter retirado. La colección en el otro cuerno sigue la misma modalidad. Algunos autores recomiendan no sacar completamente el catéter y colocar el estilete mientras la punta del catéter está en el cuerpo del útero. Debe tenerse mucho

cuidado en que la punta del estilete no pase a través de uno de los orificios del catéter ya que esto produciría, sin duda, una ruptura del cuerno.

Es difícil explicar la manipulación necesaria que se debe realizar para coleccionar casi todos los embriones del útero, pero la experiencia va enseñando "cuanto" es necesario. En la medida en que se vaya adquiriendo mayor conocimiento, el porcentaje de embriones será mayor. Es importante para el técnico que recién comienza mantener los lavados de los cuernos en forma separada, así podrá determinar en cuál de éstos aparecen los embriones.(Tribulo, H. 2008)

4.2.- Recuperación por aspiración interrumpida.

Esta modalidad es una modificación de la anteriormente descrita se diferencia fundamentalmente en la cantidad de medio de lavado utilizado en la colección de cada cuerno. Es muy simple y rápida de realizar una vez que se adquiere experiencia. Cuando el catéter está ubicado en el cuerno, el medio de colección es introducido por una jeringa (25-35ml) que se adosa al catéter. Se debe estar seguro que el medio usado alcance todas las áreas del endometrio. Luego el medio es aspirado con la misma jeringa y depositado en frascos de 500 ml, o directamente en placas de Petri. Normalmente comenzamos los dos primeros lavados con 25 ml de medio y a medida que el cuerno se va distendiendo aumentamos paulatinamente hasta 35 ml.

El 90% de los embriones serán recuperados en las 4 primeras jeringas. Se utilizan 8 jeringas por cuerno (250 ml). Nosotros sugerimos la introducción rápida del medio con la jeringa pero es importante no hacer excesiva presión, ya que se puede desgarrar el endometrio con la consecuente pérdida de medio y embriones al ligamento ancho. Tanto poca como alta presión no son adecuadas. El cuerno debe mantenerse lo más derecho posible para permitir que el medio fluya con

facilidad. Una distensión moderada del cuerno es necesaria para "despegar" los embriones de los pliegues del endometrio.

La principales ventaja del **método de recuperación por gravedad** radican en la escasa posibilidad de contaminación de los embriones porque se recuperan en un sistema que es cerrado y que el operador no necesita de un ayudante que le esté alcanzado nada ya que él mismo puede realizar la apertura y cerrado de las vías del circuito. El **lavado por jeringa** en cambio ofrece la ventaja de usar menos equipamiento y menos medio de lavado. (Tribulo, H. 2008)

5.-CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES.

No hay duda que la localización, identificación, manipulación, clasificación, y evaluación de los embriones son las tareas más difíciles que debe enfrentar aquel que está aprendiendo la técnica de transferencia de embriones.

Se clasifican de acuerdo al desarrollo morfológico. En los primeros estadios se denominan de acuerdo al número de células: 2 células, 6 células, 8 células, hasta 16 células y luego reciben diferentes nombres.

5.1.- Mórula o Estadio 4.

Se asemeja a una mora. Las blastómeras son difíciles de distinguir unas de otras. La masa de células (embrión) ocupa casi todo el espacio perivitelino (edad estimada de 5 días).

5.2.-Mórula Compacta.

Las blastómeras se han juntado formando una masa compacta. El embrión ocupa el 60-70% del espacio perivitelino.

5.3.- Blastocisto Temprano O Estadio 5.

Presenta una cavidad con fluido o blastocele, dando la apariencia de un sello como anillo. El embrión ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Se puede en este estado diferenciar en forma visual el trofoblasto y el macizo celular interno (edad estimada 7 días).

5.4.- Blastocisto O Estadio 6.

Presenta una diferencia clara entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno (más oscuro). El blastocisto es identificado con claridad y el embrión ocupa casi todo el espacio perivitelino (edad estimada 7-8 días).

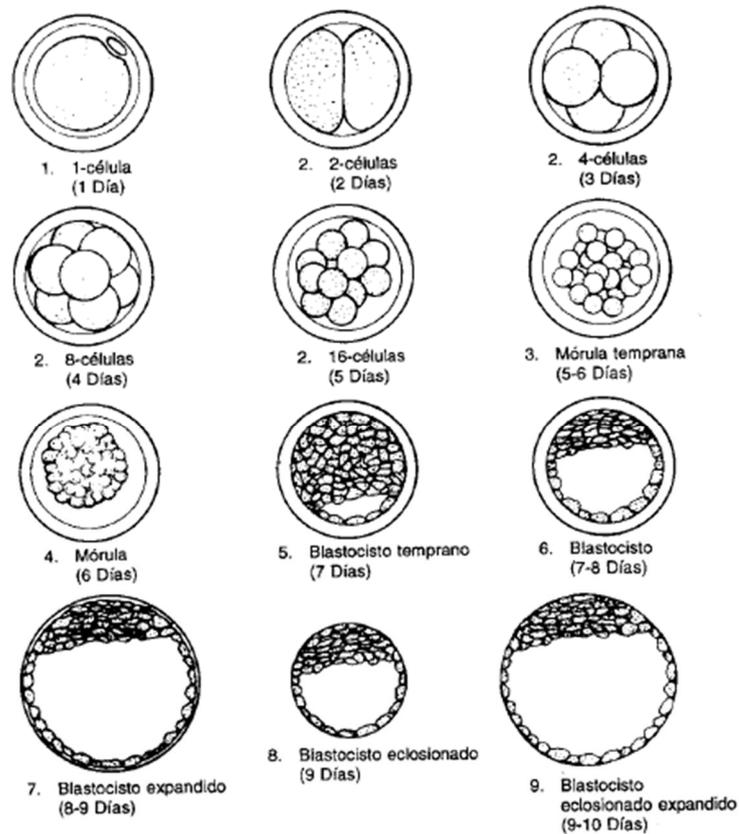
5.5.-Blastocisto Expandido O Estadio 7.

El diámetro aumenta 1.2 a 1.5 veces. La zona pelúcida se adelgaza aproximadamente 1/3 del grosor original. Los embriones en este estado se pueden encontrar colapsados (edad estimada 8-9 días)

5.6.- Blastocisto Eclosionado.

En este estado los embriones pueden estar en el proceso o estar completamente fuera de la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados son esféricos con el blastocele bien formado o colapsado. Es muy dificultosa, en este estado, la identificación del embrión por un operador inexperto (9-10 días.)

GRAFICO 7 Identificación del desarrollo de los embriones.



Autor: Tribulo, H. 2008

El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 identifica un oocito sin fertilizar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con dos a 16 células (aproximadamente día 2 a día 5). El número 3 identifica una mórula temprana, y los números 4 a 9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación, como se ilustra arriba. En una transferencia comercial, generalmente los embriones son colectados a los 6 a 8 días del ciclo estral (de mórula a blastocisto). (Tribulo, H .2008)

6.-CALIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES.

Con la calificación se pretende evaluar la calidad del embrión. Se califican en base a sus características morfológicas que lógicamente son subjetivas y dependerá muchas veces de la experiencia del operador. No hay duda que la viabilidad de los embriones sólo se puede predecir evaluando la tasa de preñez obtenida después de ser transferidos.

Algunas de las características que se analizan para calificar a los embriones se describen a continuación:

1. Forma del embrión
2. Color y textura de la masa celular
3. Número y compactado de las blastómeras
4. Diferencia de tamaño entre blastómeras.
5. Tamaño del espacio perivitelino
6. Presencia de blastómeras sueltas, degeneradas o detritus celulares.
7. Presencia, número y tamaño de vesículas (indican degeneración)
8. Apariencia de zona pelúcida.

6.1.- Grados de Calidad.

1 = Excelentes o buenos

2 = Regulares

3 = Malos

4 = Muertos o degenerados

Los embriones de calidad 1 son los mejores para congelar, los de calidad 2 pueden ser congelados con pobres resultados, pero aceptables para ser transferidos frescos. Los de calidad 3 no deben ser congelados y tienen índice de preñez regulares a malas si son transferidos frescos.

La calidad de los embriones es una de las variables que condicionan los resultados. Una buena calificación de los embriones nos permitirá predecir el porcentaje de preñez a obtener con la transferencia. (**Tribulo, H. 2008**).

7.- CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONES BOVINOS

Si el tiempo que transcurre desde la recolección y la transferencia del embrión, se logra reducir 1 o 2 horas optimizamos las condiciones de rutina. No es necesario medios de conservación, pero para intervalos mayores 6 a 12 horas se requiere usar medios de cultivo. (**Hincapie, J.J.; Brito, R.; Campo, E . 2005.**)

7.1.- Tipos de Criopreservación de Embriones Bovinos.

7.1.1.- Congelación Convencional.

El proceso de congelación podría resumirse mencionando que a medida que una solución acuosa se enfría por debajo de 0°C disminuye el movimiento molecular, sobreenfriándose hasta alcanzar una masa crítica de núcleos, momento en el cual se libera el calor latente de cambio de estado. (**Mucci, N, et al, 2005**)

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 sobreenfriada, 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. (**Dr.Sci.Agr. en 2002**)

Durante la fase inicial de preenfriamiento, (**Díez, C.; en 2003**) los embriones se exponen a la presencia del crioprotector en una fase que denominamos de equilibración. La respuesta inmediata del embrión ante la presencia de un CP (crioprotector) permeable es una rápida disminución de volumen por pérdida del agua intracelular, hasta que se alcanza el equilibrio. Este fenómeno se debe a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular y a que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores; la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del CP. A medida que el CP penetra en el embrión, éste se expande gradualmente a causa de una reentrada de agua para el mantenimiento del equilibrio osmótico. El momento en que se produce esta reexpansión refleja:

- La especie del embrión
- El estadio de desarrollo embrionario.
- El ratio superficie/volumen del embrión.
- El crioprotector utilizado.
- La temperatura de exposición.

7.1.2.- Vitriificación.

Proceso físico mediante el cual la solución de criopreservación, con alta concentración de crioprotectores penetrantes y no penetrantes, y el o los embriones en ella contenidos, alcanzan un estado altamente viscoso debido a un rápido enfriamiento, sin formar cristales de hielo. (**Díaz, C.; Muñoz, M.; Caamaño, N.; Gómez, 2004.**)

Todo el proceso desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido (NL) no requiere más de 10 minutos.

- No hay formación de cristales de hielo.
- Alta concentración de crioprotector: mayor probabilidad de daño osmótico y por toxicidad.
- Bajo costo: enfriamiento directo en N2 líquido.

El embrión está sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante la descongelación. Para obtener buenos resultados se deben tomar en cuenta los siguientes factores:

- Volumen de la muestra
- Concentración de crioprotector
- Método de adición
- Temperatura
- Tiempo de equilibrio
- Solidificación
- Tasa de enfriamiento

- cambios en el volumen
(Mucci, N, et al, 2005)

7.1.3.- Refrigeración.

Los embriones en largo tiempo y a temperatura ambiente decrecen su capacidad de desarrollo. Por medio de la refrigeración a temperaturas de 0 a 4 °C por no más de 24 horas. Se puede mantener a los embriones en PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador. Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura. La refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la congelación. (**Golanch, A 1998. y Palma, G en 2008**).

No obstante, a pesar de los buenos resultados y de su sencillez, en la actualidad ha caído prácticamente en desuso debido a que la congelación convencional se ha convertido en una técnica que si bien es más costosa, permite mantener la viabilidad embrionaria ilimitada.

7.1.3.- Crioprotectores.

Según de la Fuente, J. 2009; habla sobre los crioprotectores en la actualidad:

7.1.3.1.-De bajo peso molecular y permeables, como:

Etilenglicol, 1-2 Propanodiol, Glicerol y otros.

- Reemplazan el agua intracelular minimizando la formación de cristales.
- Regulan la deshidratación y protegen la estructura proteica.

7.1.3.2.-De bajo peso molecular y no permeables como:

Glucosa, Sacarosa y otros azúcares.

- Deshidratan las células antes de la congelación minimizando la formación de cristales.
- Estabilizan la estructura de la membrana.

7.1.3.3.-De alto Peso molecular no permeables como:

Polivinilpirrolidona, Polivinil alcohol y otros polímeros como el Ficol.

- Protegen en congelación/descongelación alterando el tamaño y la forma de los cristales.

Los crioprotectores mas permeables como el glicerol permiten la llamada “transferencia directa” se transfiere el embrión sin tener que remover el crioprotector, el embrión es descongelado y depositado en el útero. Con una tasa de preñez de 58%. (Colazo, M.G.; Mapletoft, R.J.; en 2007)

8.- PROTOCOLOS Y CURVA

8.1.-Exposición de los Embriones a las Soluciones de Congelación.

Los embriones son congelados generalmente en una solución salina tamponada fosfato (PBS) suplementada con proteínas o macromoléculas (suero bovino, albúmina bovina [BSA]), a la cual se le adiciona sustancias denominadas crioprotectoras, que modifican el comportamiento físico de la solución y protegen a las células de los daños asociados al descenso térmico. Estas sustancias pueden penetrar o no la membrana plasmática de las células embrionarias (crioprotectores penetrantes y no penetrantes, respectivamente), y en esta metodología se utilizan en concentraciones que no superan 2 Molar (M). (Niemann, H. 2001)

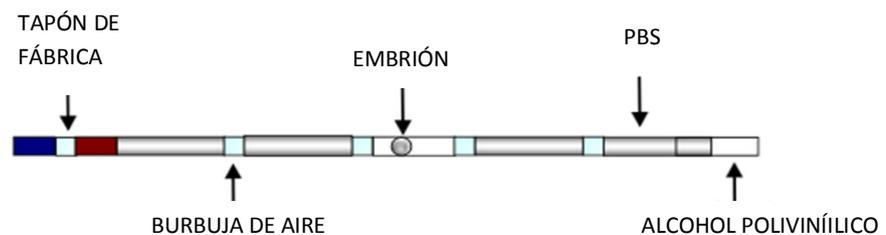
Los agentes penetrantes pueden reemplazar el agua intracelular antes del enfriamiento, lo cual en combinación con una tasa de descenso térmico lenta y controlada, reducirían los cambios de volumen celular y minimizarían la

cristalización intracelular. Los crioprotectores no penetrantes ejercen su acción a través de un aumento en la osmolaridad de las soluciones de criopreservación, promoviendo la deshidratación celular y disminuyendo entonces la formación y el tamaño de los cristales de hielo. (Palma, G.A 2008)

8.2.- Envasado de los Embriones.

Actualmente el elemento más utilizado para contener los embriones, tanto para la criopreservación como para su transporte y/o transferencia a una hembra receptora, lo constituye la pajuela de plástico de 0,25 ml de capacidad. Existen diversos modos de cargar las pajuelas, pero en la mayoría, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0,5 a 2 centímetros de solución de congelación separado de otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa como en el método One-Step (descrito más adelante), separada por burbujas de aire. En general, las pajuelas un vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico. (Leibo, S.P. 2000)

GRAFICO 8 Esquema de una pajuela plástica para cargar embriones



FUENTE (Dr. MVZ PhD Gustavo A. Palma)

8.3.-Enfriamiento Inicial.

Se efectúa mediante la introducción de los embriones envasados en la criocámara de una máquina congeladora programable. Así, la muestra se enfría desde la temperatura de equilibrio hasta alrededor de -7 °C

8.4.-Inducción de la cristalización o "seeding".

Esto se efectúa luego de 5-7 minutos de introducidas las pajuelas en la criocámara, tocando el extremo de las pajuelas con un elemento metálico enfriado en N₂ líquido. Con este procedimiento se evita un sobreenfriamiento excesivo de la solución y por lo tanto, se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación de calor latente de cambio de estado.

8.5.-Descenso térmico lento y controlado.

El descenso térmico se efectúa utilizando máquinas congeladoras programables, desde la temperatura en la cual se induce el "seeding" hasta -30 a -40 °C según lo descrito por Willadsen, y a tasas comprendidas entre -0,3 y -0,5°C/minuto. De este modo se logra una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización intracelular.

8.6.-Descenso térmico rápido.

Alcanzada la temperatura de -30 a -40°C las pajuelas se introducen directamente en N₂ líquido. De este modo se alcanza, junto con el descenso térmico lento, una formación controlada de cristales de hielo en la solución de congelación, determinando finalmente la vitrificación del embrión y del medio que inmediatamente lo rodea.

8.7.-Almacenamiento en N₂ líquido.

Se efectúa en contenedores (termos) de N₂ líquido a -196° C.

8.8.-Descongelación.

Este procedimiento debe efectuarse de manera rápida para impedir el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación, indicaron que un descongelamiento lento otorga el tiempo suficiente como para permitir la desvitrificación extra e intracitoplásmica lo que puede conducir a una baja sobrevivencia poscriopreservación. Para la descongelación, las pajuelas son retiradas del N₂ líquido e introducidas en un baño María a 30°C aproximadamente.

8.9.-Extracción de los crioprotectores.

Luego de la congelación-descongelación, la mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones antes de ser transferidos a hembras receptoras o colocados en cultivo. Esto debe efectuarse porque si al momento de la descongelación, las células cargadas de crioprotectores son expuestas, por ejemplo, a una solución de PBS isomolar respecto de las células en condiciones normales o al tracto reproductor femenino, debido a que el agua difunde más rápido que estos compuestos a través de la membrana plasmática, las células se desintegrarían por el shock osmótico. Por este motivo, se recurre a la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crio-protector utilizado. Otra alternativa es emplear sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante. (**Rall, W E; Fahy, G. M. 2003**)

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

En el presente capítulo se detalla, los materiales, equipos, implementos, herramientas, métodos y tipo de investigación, la ubicación del lugar donde se llevó a cabo el ensayo de la evaluación de la superovulación y la evaluación de embriones bovinos por congelación lenta y vitrificación con los equipos del laboratorio de biotecnología reproductiva de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

2.1. MATERIALES

2.1.1. Recurso Humano

Postulantes: Diego Armando Esparza Álvarez y Edison Ricardo Parra Jiménez

Director: Dr. Cristian Arcos Álvarez

2.1.2. Materiales De Oficina

- Libreta de campo
- Etiquetas
- Papel bond

- Copias
- Internet
- CD
- Impresora
- Esferos
- Flash memory
- Laptop
- Cámara .

2.1.3. *Materiales De Laboratorio*

- Guantes ginecológicos
- Guantes de chequeo
- Jeringuillas de 10 y 20 ml
- Ecógrafo
- Sondas tipo Foley
- Filtros
- Sondas de lavado de dos vías
- Matraces boca ancha
- Mandril metálico
- Guía de sonda
- Placa térmica
- Cajas Petri
- Cajas vioticol
- Estereomicroscopio

2.1.3. *Movilización*

- Transporte terrestre

2.2. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DEL ENSAYO DE LA EVALUACIÓN DE LA SUPEROVULACIÓN EN LA HACIENDA “LA JIMENITA” PROVINCIA DE COTOPAXI, PARROQUIA ALAQUEZ.

2.2.1. Ubicación Política Geográfica De La Práctica

La práctica se realizó en la Hacienda “La Jimenita”, provincia de Cotopaxi, parroquia rural Alaquez, barrio San Antonio, en la que se determinó la evaluación de la superovulación con la hormona FOLLTROPIN-V (PPFE) para la obtención de embriones viables para la crioconservación.

2.2.2. División Política Territorial

Provincia: Cotopaxi

Cantón: Latacunga

Parroquia: Alaquez

Barrio: San Antonio

Fuente: Google maps

2.2.3. Situación Geográfica.

Longitud: -78.6

Latitud: -1.13333

Altitud: 3100 msnm.

Superficie territorial: 142 Km²

Fuente: Google maps

2.2.4. Condiciones Climáticas

Humedad relativa promedio: 75%.

Temperatura promedio: 8 a 15 ° C.

GRAFICO 9 Mapa de Ubicación de la parroquia Alaquez.



Fuente: Plan de desarrollo territorial GAD Cotopaxi.

Tabla 4 Características Climáticas y Edafológicas

Variables	Características climáticas y edafológicas
Precipitación	500 a 1000 ml de lluvia anual.
Nubosidad promedio	Irregular.

Altitud	3080 m.s.n.m.
Humedad relativa	73.56% anual.
Clima	Seco Templado.
Temperatura	13.5 C promedio anual.
Heliografía	145.5395 horas sol/mes/promedio anual”
Velocidad del viento	2.5 m/s
Viento dominante	SE
Pluviosidad	550 mm anuales.

Fuente: (INAMI, 2013)

2.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Los tipos de investigación que se utilizaron son de tipo: descriptiva, exploratoria, y no experimental.

2.3.1. Investigación Descriptiva.

Se recopiló la información investigativa, es decir los resultados se obtuvieron en el desarrollo de la investigación, el mismo que por sus condiciones y especificidad se efectuó en el lugar donde se realizó la investigación.

2.3.2. Investigación Exploratoria

La investigación se fundamentó en bases científicas, tomando información relevante de documentos, libros, revistas científicas, tesis, proyectos de internet, e internacionales, las mismas que facilitaron la elaboración de la investigación.

2.3.3. Investigación No Experimental

Se entiende por investigación no experimental cuando se realiza un estudio sin manipular deliberadamente las variables. La investigación no experimental es la búsqueda empírica y sistemática, en el método no experimental el investigador se limita a seleccionar los sujetos que ya poseen esos valores de la variable independiente.

2.4. METODOLOGÍA

En el presente trabajo investigativo se utilizaron los métodos inductivo y deductivo.

2.4.1.- Método Inductivo

El método inductivo intenta ordenar la observación tratando de extraer conclusiones de carácter universal desde la acumulación de datos particulares.

En la presente investigación se aplicará este método para adquirir conclusiones del proceso del ensayo de tal modo que permita conseguir datos definidos y fiables.

Este método es el que va de lo general a lo específico es utilizado en la parte de recopilación de datos como se detalla en el capítulo uno.

2.4.2.- Método Deductivo

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

En esta investigación se utilizará para establecer una observación detallada de cada uno de los procesos con el fin de lograr resultados verdaderos en la evaluación de los embriones bovinos congelados por vitrificación y congelación lenta.

2.5. MANEJO DEL ENSAYO.

2.5.1. *Chequeo Ginecológico.*

Un chequeo ginecológico nos permite:

- Determinar el momento del ciclo estral.
- Anormalidades anatómicas y funcionales.
- Diagnóstico de gestación.
- Estimación de la edad fetal.
- Control de la ovulación.
- Ultrasonografía.

2.5.2. *Palpación Rectal Para La Determinación De Cuerpos Lúteos.*

La palpación rectal es una práctica, consiste en introducir la mano por el recto de la hembra bovina el cual es lo suficientemente elástico que permite la exploración

de los ovarios con lo cual podemos determinar la presencia o no de cuerpos lúteos.

2.5.3. Establecimiento Del Protocolo De Superovulación.

Tabla 5 Protocolo de superovulación con FOLLTROPIN-V

DIA	HORA	DOSIS	OBSERVACIONES
LUNES	4:00 PM	4 ml	
MARTES	4:00 AM	3 ml	
MARTES	4:00 PM	3ml	
MIERCOLES	4:00 AM	2.5 ml + 4ml PG2	PG2= Prostaglandina
MIERCOLES	4:00 PM	2.5ml	
JUEVES	4:00 AM	2 ml	
JUEVES	4:00 PM	1.5 ml	
VIERNES	4:00 AM	1.5ml	
VIERNES	4:00 PM	Inseminar	
SABADO	4:00 AM	Inseminar	
VIERNES	-----	-----	6-7 Días lavado de Embriones

Fuente: Directa

Autor (MVZ. Arcos, C. 2015)

2.5.4.-Lavado de Embriones.

Consiste en extraer los embiones de la vaca donadora entre lo 6 y 9 días después del estro (7 días promedio) los cuales se encuentran por lo general en la punta de los cuernos uterinos se utiliza un método no quirúrgico.

2.5.5.-Determinación De Los Embriones Congelables Y No Congelables.

En nuestro caso utilizaremos los embriones aptos para la crioconservación previo a la congelación se realizara un proceso de evaluación morfológica de los mismo asegurando que no presenten ninguna anomalía q afecte directamente la viabilidad del embrión al exponerlo a temperatura muy bajas (-196|°).

2.6.- Vacas Donadoras.

Donadoras: 3 Vacas de alto valor genético que cumplan con un buen manejo alimenticio, sanitario, no presenten enfermedades hereditarias.

2.7.-Unidad Experimental.

La investigación se realizó en 3 vacas donadoras de las cuales se pudo observar el número de folículos ováricos, y cuerpos lúteos pos ovulación.

2.8.-Distribución del Ensayo.

Tabla 6 Distribución del Ensayo.

DONADORAS	EMBRIONES CONGELADOS	EMBRIONES NO CONGELADOS	TOTAL
VACA 1			
VACA 2			
VACA3			

Fuente: Directa

Fuente (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

2.9.- Diseño Experimental.

Se realizará la prueba no es experimental ya que se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño.

2.10.- Descripción de los Tratamientos

Tabla 7 Descripción de los Tratamientos

CONGELACIÓN	SIMBOLOGIA	UNIDAD EXPERIMENTAL
Vitrificación	T1	
Congelación Lenta	T2	
TOTAL		

Fuente: Directa

Fuente (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

2.11.- Operacionalización de las categorías fundamentales.

Tabla 8 Variables para la evaluación de los embriones bovinos en el laboratorio de biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES
EMBRIONES	Congelación Lenta Vitrificación	Número (#)

Fuente: Directa

Fuente (Esparza, D. y Parra, E. 2015).

CAPITULO III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente capítulo se demuestra mediante tablas y gráficos la diferencia establecidas entre el manejo de las dos técnicas de preservación de embriones bovinos in vivo las que son crioconservación lenta y vitrificación.

3.1 NÚMERO DE EMBRIONES COLECTADOS

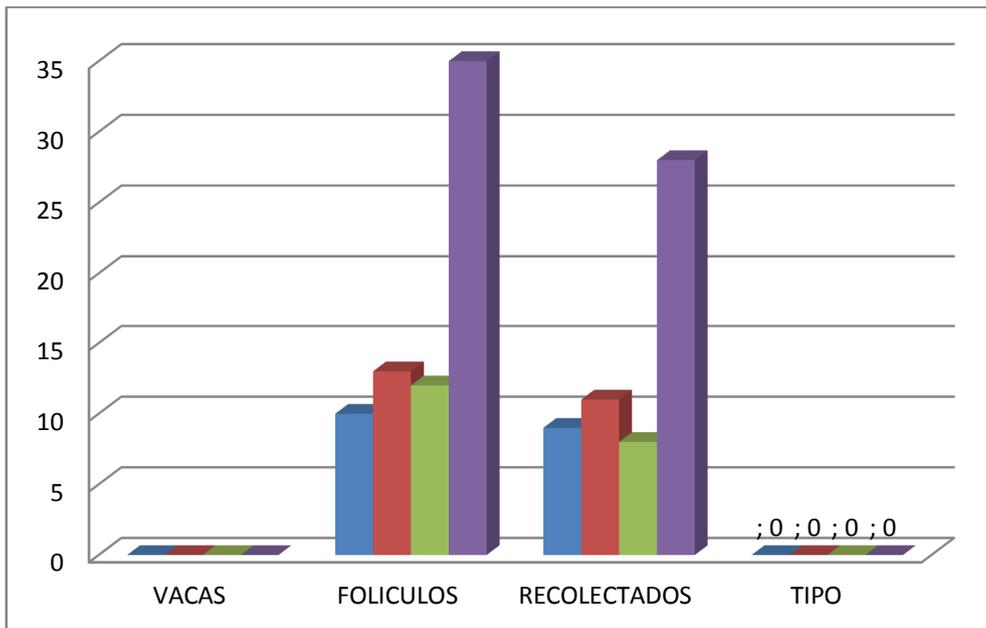
Tabla 9 Número de Embriones Colectados de cada Vaca

DONADORAS	Embriones Congelables	Embriones no Congelables	TOTAL
Vaca 1	10	9	Mórulas Compactas
Vaca 2	13	11	Mórulas Compactas
Vaca 3	12	8	Mórulas Compactas
TOTAL	35	28	Mórulas Compactas

Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015).

GRAFICO 10 Número de Embriones Colectados.



Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

En el tabla N° 9 y gráfico N° 10 se observa los folículos de las vacas un total de 35 y los recolectados por lavado 28 embriones dando los resultados de cada una de las vaca uno 9, vaca dos 11, vaca tres 8 embriones.

3.2 CALIDAD DE EMBRIONES

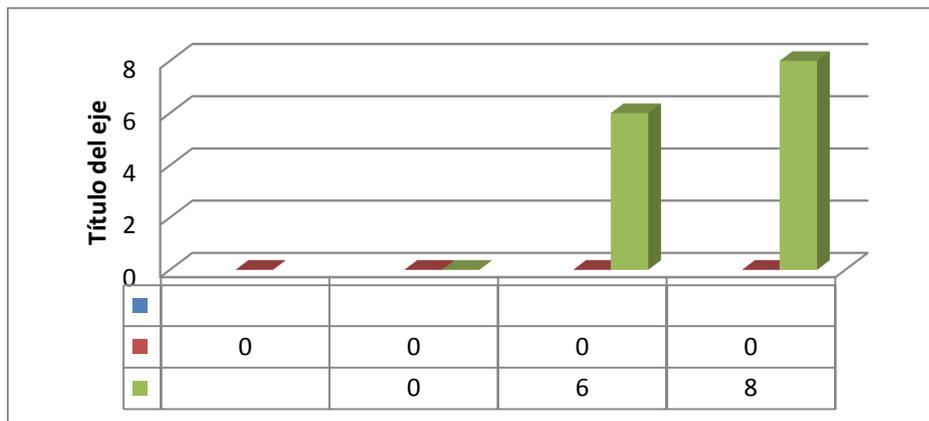
Tabla 10 Calidad de los Embriones Colectados.

CALIDAD			
VACAS	C I	C II	C III
Vaca 1	6	2	1
Vaca 2	8	3	0
Vaca 3	7	0	1
TOTAL	21	5	2

Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

GRAFICO 11 Calidad de los Embriones Colectados.



Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015).

En el tabla N° 10 y el grafico N° 11 se ve que de los 28 embriones que se obtuvo de las tres vacas 21 son de calidad I; 5 de calidad II; 2 de calidad III de los cuales los de calidad I y II son aptos para poder ser congelados.

3.3 CONGELACIÓN LENTA Y VITRIFICACION

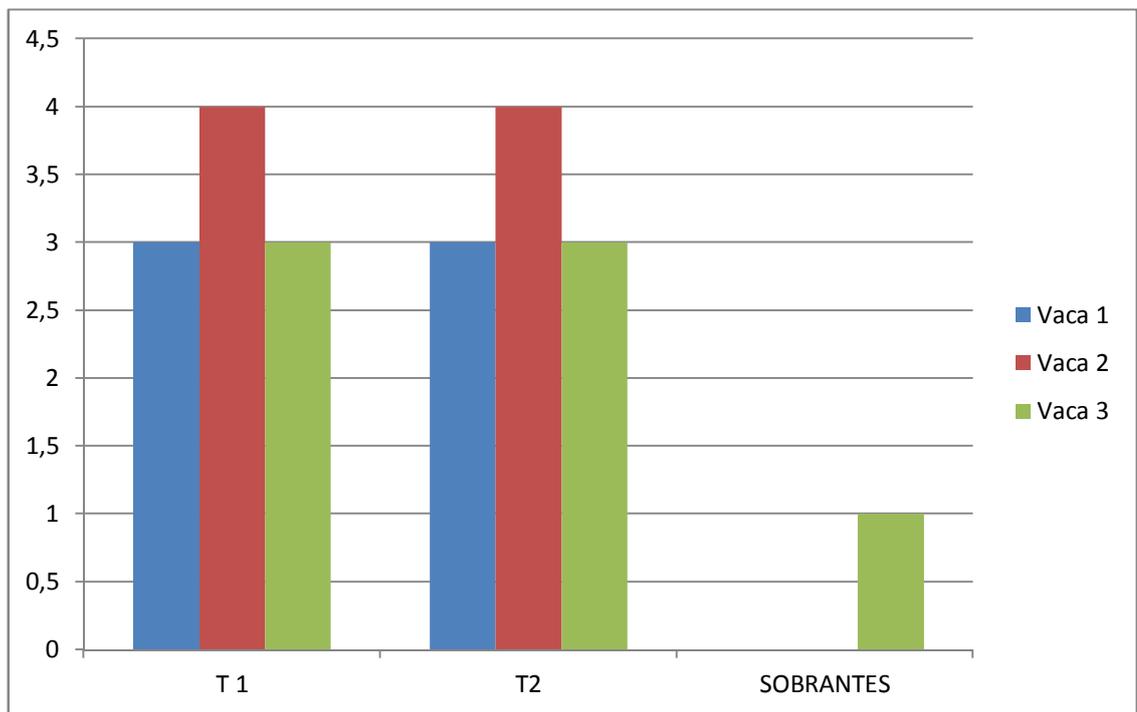
Tabla 11 Distribución según la Calidad.

TRATAMIENTO	T 1	T2	SOBRANTES
Vaca 1	3	3	
Vaca 2	4	4	
Vaca 3	3	3	1

Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015).

GRAFICO 12 Distribución según la Calidad.



Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

En el cuadro N° 11 y el grafico N° 12 se diferencia de los tratamientos de la congelación lenta y vitrificación 3 ,4, 3 embriones respondieron a la congelación lenta en la cual corresponde al tratamiento uno y 3, 4,3 embriones respondieron a la vitrificación en el tratamiento dos, con un sobrante de un embrión de la vaca tres. De los cuales las dos técnicas dan el mismo resultado al momento de la congelación lenta y la vitrificación.

3.4 POST-DESCONGELADO Y VITRIFICACIÓN

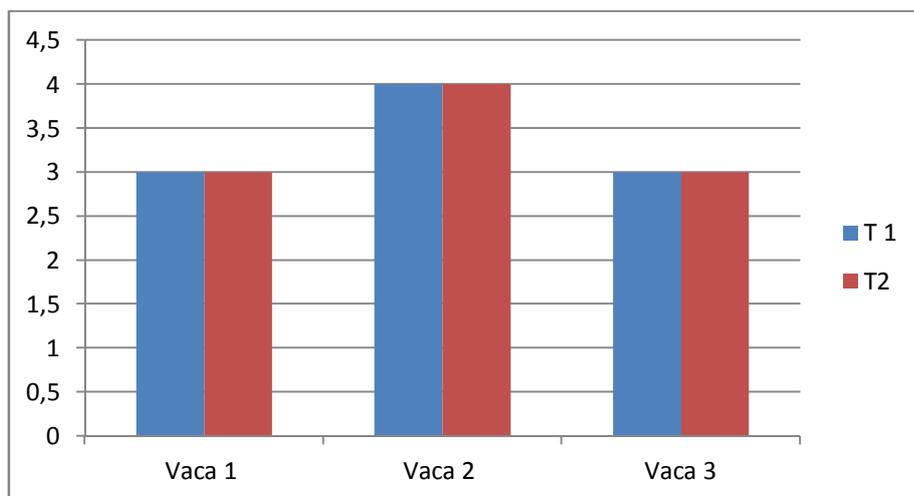
Tabla 12 Evaluación postdescongelado y Desvitrificación.

TRATAMIENTO	T 1	T2
Vaca 1	3	3
Vaca 2	4	4
Vaca 3	3	3

Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

GRAFICO 13 Evaluación postdescongelado y Desvitrificación.



Fuente: Directa

Elaborado por: (Esparza, D. y Parra, E. 2015)

En el tabla N° 12 y el gráfico N° 13 se ve que en los tratamientos posdescongelado y desvitrificación los embriones de las tres vacas responden a los dos tratamientos sin tener ninguna variación de los cuales los dos tratamientos dan el mismo resultado.

3.5. Conclusiones.

El resultado de la vitrificación está condicionado previamente por dos factores. La calidad del embrión y el estado de desarrollo embrionario. Cuando se congelan embriones de calidades muy buena y buena se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular. La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación de embriones es mórula compacta a blastocisto expandido, siendo más sensibles a las bajas temperaturas los embriones producidos *in vitro*.

Para elegir el mejor método de vitrificación se deben tomar en cuenta diferentes factores como son los siguientes: crioprotectores a utilizar, estos deben manejarse en adecuada concentración, adicionarse al embrión en forma creciente y a tiempos determinados, en combinación con otros crioprotectores que sean de baja toxicidad, para que sean utilizados con el menor volumen posible, temperatura de adición y con tasas de enfriamiento lo suficientemente rápidas para evitar la pérdida del equilibrio osmótico y causar daño celular que comprometa la viabilidad embrionaria.

Es importante contar con un proceso de Evaluación de embriones Bovino a congelación lenta, siendo necesario contar con un registro para, llevar en cuenta el proceso de recolección tanto del donante cómo de la receptora, de esta manera podrías comprender si el producto, tratado, en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad Técnica de Cotopaxi, que trabaja mejorando este proceso, para tener las bases suficientes y emitir un criterio comprobado.

Esta técnica de Congelación lenta de los embriones de Bovinos, es un proceso no reciente, pero que en los últimos años ha tomado mayor fuerza, por ser comprobado su eficiencia, de tal manera, que los ganaderos, y los Médicos veterinarios recomiendan este proceso, porque al realizar la evaluación de los embriones bovinos, se han encontrado resultados positivos, que fomentan un rendimiento alto en la reproducción, al momento de realizar la transferencia a una vaca.

El proceso de Vitrificación ayuda en la conservación por largo tiempo el embrión vivo, para luego durante la transferencia se puede determinar los genes de la donante, para poder evaluar la calidad del embrión, cómo del ganado obtenido, entonces es imprescindible potenciar la eficacia del embrión previo a la inseminación en la receptora.

Es importante conocer los procedimientos que el médico veterinario realiza, para determinar si los órganos femeninos de las vacas están libres de anomalías, libres de alguna enfermedad para que el proceso de transferencia del embrión bovino presente una adecuada asimilación, para que tenga cómo resultado positivo en torno a la reproducción.

3.6. Recomendaciones.

Se recomienda a los estudiantes que realizan el trabajo de investigación hacerlo tomando las debidas precauciones en torno a la utilización de los materiales, aparatos y utensilios que aporten en la conservación de los embriones Bovinos, para ser realizados la transferencia de manera adecuada, con una sola idea mejorar el proceso de conservación por medio del nitrógeno, para luego transferir a una receptora eficientemente.

Es necesario realizar la Evaluación de los embriones Bovinos a congelación lenta, para determinar el grado de aceptación que presenta durante la conservación, para luego utilizar en las vacas, estos procedimientos se necesitan ser analizados, estudiados, mediante la verificación de los resultados obtenidos por medio de la manipulación experimentación y las diferentes pruebas a someter para que tenga resultado tanto la congelación lenta, cómo la vitrificación así mismo la transferencia.

Es importante llevar un registro de todos los aspectos que dentro del laboratorio de Biotecnología los estudiantes que realizan las prácticas sobre los embriones de ganado vacuno se realizan ahí para obtener datos, es importante recalcar que la evaluación también sirve para tomar correcciones mediante las decisiones durante el proceso de congelación lenta y vitrificación del embrión, que debe conservarse vivo por mucho tiempo antes de realizar la transferencia a la vaca.

Es importante potenciar la Técnicas de conservación de los Embriones Bovinos a congelación y vitrificación, que requiere de un cuidado desde el momento de la manipulación y experimentación para ubicar en el termo con nitrógeno, para

preservar a largo plazo, pero es necesario una evaluación acorde a los parámetros de la técnica establecida para mejorar las condiciones del proceso vitrificación.

BIBLIOGRAFÍA

Bartolomé, J.A. Endocrinología y fisiología de la gestación y el parto en el bovino. Taurus, Año 11, Nro 42, 20-28. ISSN 1515-3037

Calderón, R. Técnicas de diagnóstico del estado reproductivo de las hembras bovinas por palpación rectal. UNAM,2011. Pp 5- 19.

Chaffaux, S. Evolution de l'image Échographique de produit de conception chez la vache. Bull. Acad. Vét. Fr.,55:213-221.

Colloton, J. 2002. Pictorial Guide to Ultrasonographic Pregnancy Diagnosis in the Bovine. Steuart Laboratories and Bovine Services, LLC. Pp 10- 35.

DesCôteaux L, Colloton J, Gnemmi G. 2009 Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography. Ames (IA): Wiley-Blackwell; 2009.

DeJarnette, M. Nebel, R. "Select Sires." Select Sires: Select Reproductive Solutions. Consultado el 10 Oct 2011.

Díez, Natalia. (1997). Fundamento de la ecografía. En: Tamayo, M. et al. 5º Curso Práctico de Reproducción en Vacuno - Cursos Veterinarios Práctico de Navarra, Facultad de Medicina Veterinaria, UNAH, La Habana, Cuba.

Diaz T, Pancarci SM, Drost M, Schmitt EJ, Ambrose JD, Fredriksson WE, Thatcher WW. (2001). Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses. *J. Dairy. Sci.* 84:88-99

Sartori R, Barros C. 2011. Reproductive cycles in bos indicus cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 244–250

Forde N, Beltman M, Lonergan P,

Diskin M, Roche J, Crowe M. 2011. Oestrus cycles in Bos taurus cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169.

Citas del Internet.

http://www.selectsires.com/programs/docs/reproductive_anatomy.pdf>. 105

http://www.drostproject.org/sp_bovrep/guide.html

<http://www.engormix.com/MA-ganaderiacarne/genetica/articulos/reproduccion-sistema-doble-proposito-t2885/p0.htm>>.

<https://www.dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>

[https:// www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578](https://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578)

[https://wwwbooks.google.com/books/.../Biotecnología_de_la_reproducción.html?
hl...](https://wwwbooks.google.com/books/.../Biotecnología_de_la_reproducción.html?hl...)

<http://genex.crinet.com/page3702/PregChecksWhyFrequencyAndMethodMatter>

Libros.

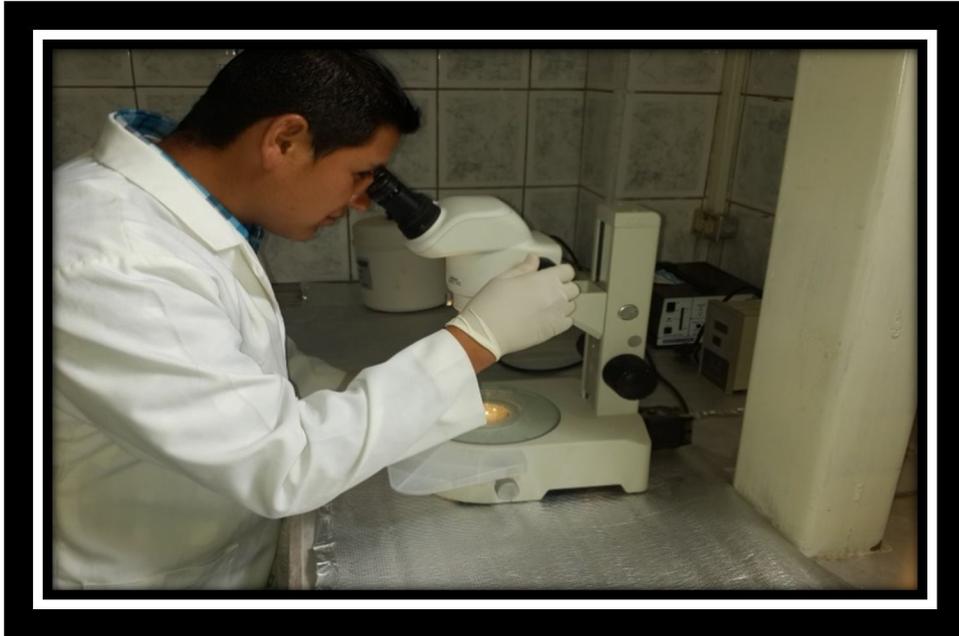
Bartolome, J.A. Endocrinología y fisiología de la gestación y el parto en el bovino. Taurus, Año 11, Nro 42, 20-28. ISSN 1515-3037

RAMIREZ F, Inseminación y transferencia de embriones en animales de la granja – grupo latino editores 2010 ISBN 978-958-736- 016-5

TRÍBULO H ,Transferencia de Embriones y Nuevas Tecnologías Humberto Elías Tríbulo [et.a].. 1ª ed. 2ª reimp.- Córdoba: IRAC, 2008 ISBN 978-987- 22915-3-2

ANEXOS

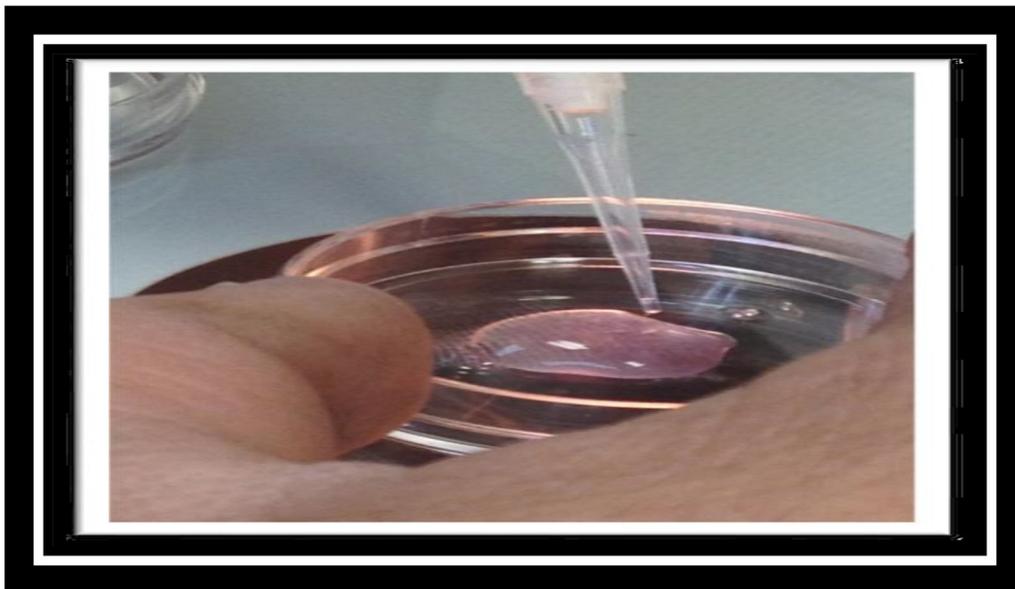
Búsqueda de embriones en el Estereoscópico



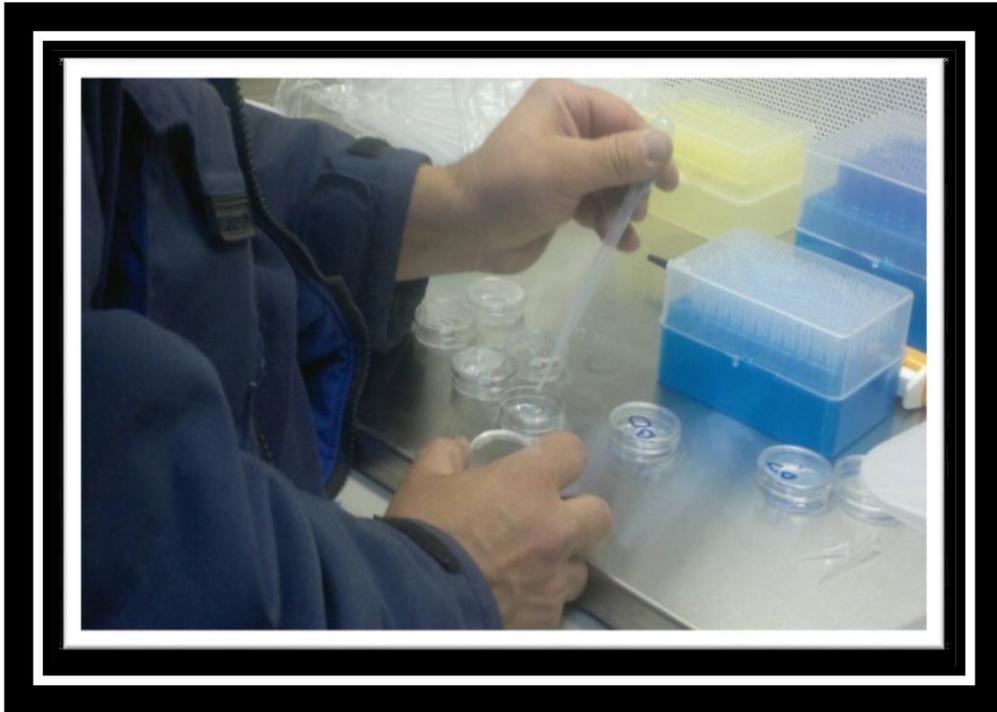
Selección de embriones viables para la congelación lenta y vitrificación



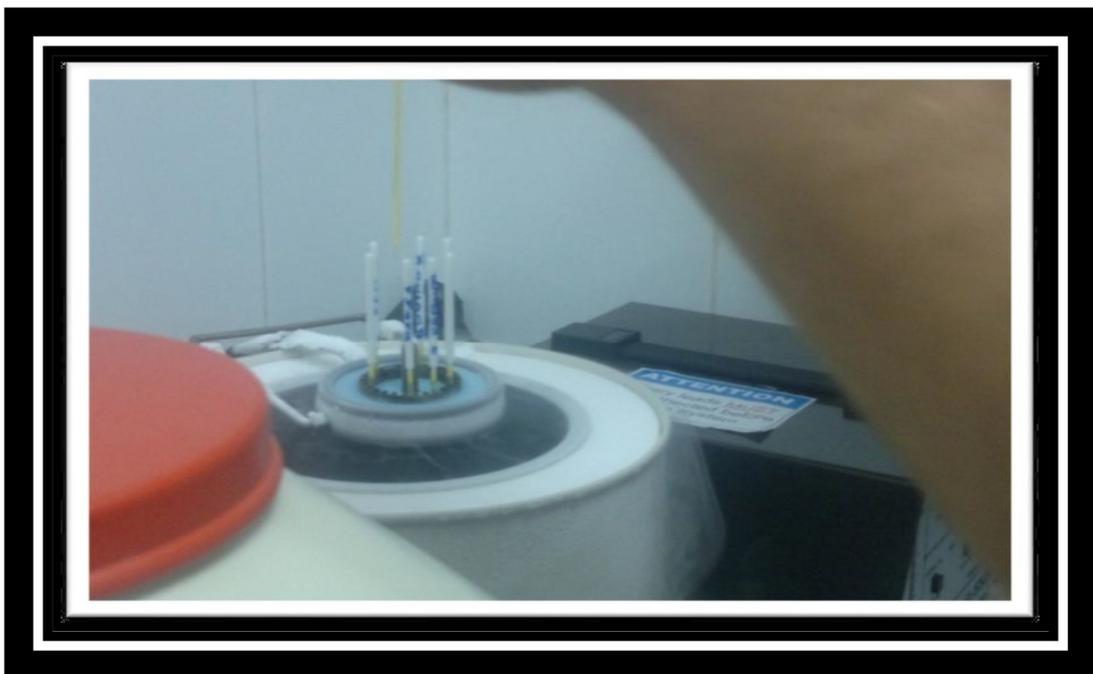
Medio de mantenimiento de los embriones previo al llenado de la pajilla para posteriormente ser congelada



Llenado de pajillas con un embrión viable para la congelación



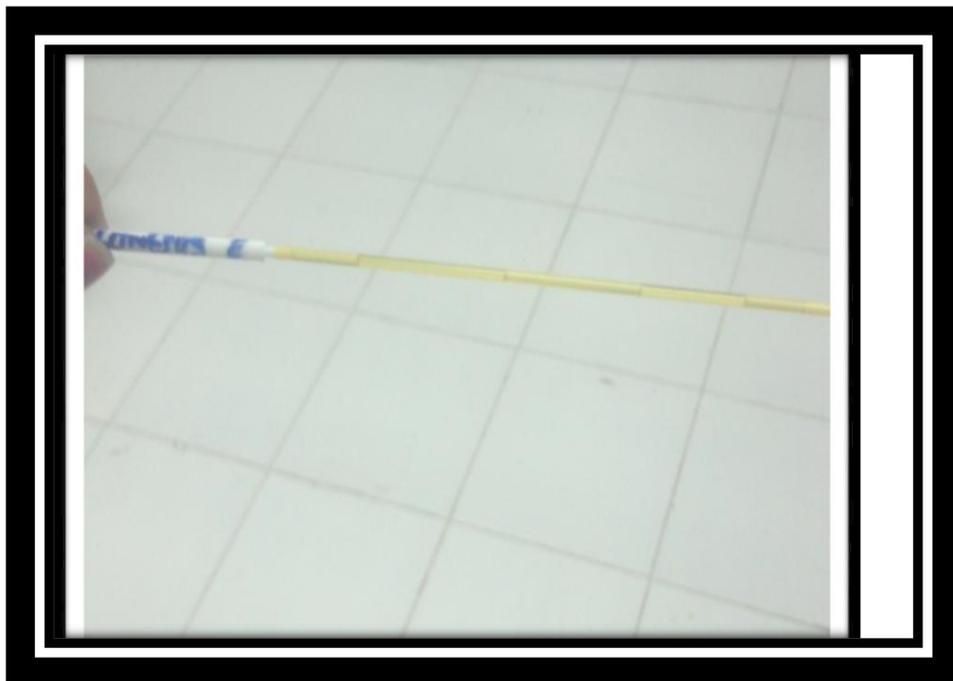
Ubicación de las pajillas en la criogenic para el descenso controlado de la temperatura



Almacenamiento de las pajillas congeladas en el termo de nitrógeno líquido



Obtención de una pajilla para la evaluación del embrión



Proceso de descongelación del embrión



Evaluación de estructuras celulares post descongelación

