



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECHNIA

**EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE
EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO COMO FUENTE
LA HORMONA GnRH (FERTAGYL)**

TESIS QUE PRESENTA

YOSHIO IVÁN MACSWINEY ROMÁN

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Asesor:

Dr. Ariel Jiménez Torres

Morelia, Michoacán; Junio del 2005.



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECA

**EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE
EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO COMO FUENTE
LA HORMONA GnRH (FERTAGYL)**

TESIS QUE PRESENTA

YOSHIO IVÁN MACSWINEY ROMÁN

**PARA OBTENER EL TITULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Morelia, Michoacán; Junio del 2005.



AGRADECIMIENTOS

A Mi Señor Dios

Por permitirme concluir mi carrera, por la familia tan bella que me dio y que pese a las adversidades me ha permitido lograr un buen desempeño académico y social en toda mi vida.

A mi madre:

Imelda Román Castillo.

Por ser padre y madre pues es una tarea difícil y ella ha sabido compensar el terrible hecho de crecer sin un padre, pero gracias a ella no me sentí en desventaja jamás, y sí con un apoyo moral, espiritual completo gracias mamá y el haberme permitido terminar mi carrera, por su apoyo económico, y sentimental.

A mis Abuelos Queridos:

Adrea Castillo y Celedonio Román

A mi abuelita **Andrea** Por todo el cariño que siempre me demostró que mas que una segunda madre fue para mí una gran madre pues con ella fue que me crié y me ayudo a formar los valores y el carácter que hoy por hoy, son ya parte de mi, gracias abuelita

A mi abuelo **Celedonio**, por que si una figura paterna tuve fue la de el, por mostrarme la guía de cómo debe ser un hombre con valores y principios que me han ayudado a el bienestar de mi persona, **Gracias mis bellos Abuelos ; Gracias !**

**A mis asesores.****Dr. Ariel Jiménez torres**

Por el apoyo que me ha brindado en todos los proyectos, no solo en la tesis, si no como profesor y amigo en el transcurso de vida que me toco conocerlo y apreciarlo y su gran temple para motivar al Médico Veterinario Zootecnista Investigador que llevo dentro, su infinita paciencia, y su gran carácter digno de mi admiración.

Al Dr. Fernando Pintor Ramos.

Pues su calidad humana y ética me han permitido conocer como guiarme en el porvenir de mi vida profesional y el apoyo incondicional que siempre mostró y por ello mi agradecimiento más sincero.

Al Dr. Javier Jiménez Custodio.

Por la paciencia y buena voluntad que sin su apoyo y sus consejos seria más difícil mi titulación, así como sus comentarios positivistas siempre me ayudaron y me sirvieron para poder ser una persona emprendedora y entusiasta como el siempre lo fue para mi.

A mis hermanos.

Venus Macswiney, Héctor Said Macswiney, Guadalupe Macswiney, por el apoyo que me han dado a través del transcurrir de mi carrera y la confianza en mi para terminar mis estudios y por el apoyo de cada uno de ellos que aun que distinto cada uno me lo hicieron sentir, es pues que les agradezco y ala vez paso el reto y la responsabilidad que una vez mi hermana Venus paso a mi y ahora yo lo hago con Héctor y Guadalupe, así pues quiero recordarles que igual cuentan con mi apoyo.



A mis amigos.

En especial a Estudiante de **MVZ Blanca Aurora Martínez**, por ser mi amiga, y mi novia agradecida y paciente, a la **PMVZ Carolina Jannet Olivares Rodríguez**, a **PMVZ Edna Noemí Cruz Baltazar**, a **Vania Ivette Cruz Baltazar**, a **Mónica Yedith Cruz Baltazar**, a **PMVZ Rafael Rodríguez González(Rabioso)**, **PMVZ Sandino Feliciano López Rodríguez**, y a **Rafael García (Zirahuén)** así como a los profesores en general que me apoyaron en mi formación y que con gusto los recuerdo como los mejores y que sin duda han sembrado en mi el amor por mi carrera y mi profesión, entre otros; muchos que se me escapa por mencionar, a todos los que han hecho esfuerzos por alentarme a continuar siempre hacia adelante, por su apoyo emocional, material, científico y por confiar en mí.

En general al personal de la facultad de Medicina Veterinaria, Por proveerme de las armas necesarias para concluir mis estudios. En especial a los Bibliotecarios. Miguel, Alex, Eduardo y a Don Willie de las copias.

Y a todos quienes no he olvidado mencionar, solo que me es imposible mencionar por el espacio tan pequeño aun así a todos ellos

¡GRACIAS!



ÍNDICE.

ÍNDICE GENERAL.	X
INTRODUCCIÓN	1
ANATOMIA.	4
El aparato reproductor de la coneja.	
Formación de los gametos.	
Estructura del óvulo.	
DESARROLLO EMBRIONARIO.	15
ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.	21
MADUREZ SEXUAL Y PUBERTAD.	26
OVULACIÓN Y FECUNDACIÓN.	29
MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.	30
RECOLECCIÓN DE OVARIOS EN ANIMALES POST-MORTEM.	30
Método de corte.	
Método de aspiración.	
CRIOCONSERVACIÓN.	44
APLICACIONES DE LA CRIOCONSERVACIÓN.	45

EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOLECCIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román



INVESTIGACIÓN Y CRIOBIOLOGÍA.	47
ETAPAS DEL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN.	51
HIPÓTESIS.	53
OBJETIVOS.	54
MATERIALES Y METODOS.	55
PERIODICIDAD DEL PROYECTO.	57
MATERIAL BIOLÓGICO.	57
2DA ETAPA.	59
MATERIALES PARA LA ELABORACIÓN.	62
RESULTADOS.	64
CONCLUSIONES.	67
AGRADECIMIENTOS.	68
ANEXOS.	70
Cronograma de actividades.	
Cuadro de control de montas.	
Peso de las conejas.	
Análisis bromatológico de la etiqueta.	
BIBLIOGRAFÍA.	76



INTRODUCCIÓN

En la última mitad de siglo los descubrimientos en el área de la reproducción han tenido avances sorprendentes, atrayendo la atención del mundo entero, esto es debido al gran número de descubrimientos surgidos a partir de los años de 1950, entre los más trascendentales están el de James Watson y Francis Crick en 1953, el cual significó el despertar de las ciencias de la biología molecular y la genética moderna que impactaron de manera espectacular en las demás ciencias como la medicina, la farmacología y las ciencias de la reproducción.

Estos descubrimientos aportaron más conocimientos, pero también atrajeron más dudas, lo que atrajo más investigación, así los descubrimientos no cesaban y las tecnologías en materia de reproducción fueron perfeccionándose hasta la actualidad, donde estas técnicas avanzan cada vez más y refinan con el paso del tiempo, y donde hoy a inicios del siglo XXI no es raro escuchar de los avances en materia de reproducción, y cada vez países se suman a los que practican a diario estas técnicas para eficientar su producción.

El desarrollo ha sido inimaginado y hoy en día el hablar de Superovulación, Inseminación Artificial (I. A), Sincronización, Extracción de embriones, Clonación, Congelamiento de embriones son cada vez más usuales, pues son las herramientas de la Ingeniería Genética que permitirán el lograr los avances en biomedicina, agricultura y ganadería.



Para lograr dichos avances se necesario el delimitar y establecer los conocimientos preliminares, el estudio y la investigación en estas áreas de la biomedicina nos permitirán el afianzamiento de los conocimientos para sacar adelante estos proyectos en beneficio de las necesidades humanas.

Las investigaciones han demostrado que las relaciones altas de Hormona Lutunizante (LH) y Folículo Estimulante (FSH) afectan la capacidad del ovario para responder a los tratamientos con gonadotropinas exógenas.

El efecto de altos contenidos de LH en los preparados para superovulación, ha sido bien demostrado por Mapletoft y col. (1990) al incrementarse la dosis de preparados conteniendo LH en niveles por encima de los considerados óptimos. Estos produjeron un deterioro en la calidad de los embriones.

Estudios sobre situación de inducción a la superovulación con Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH) reportados por Escriba y col. (2001) demuestran que al ser inyectadas por vía intramuscular las conejas con GnRH (**20µFertagyl, Intervet, México**) el tracto reproductor de la coneja responde con descargas de LH y FSH optimizando la maduración de los folículos y la liberación de los mismos y la calidad de los embriones se ve afectada mejorando los resultados de cantidad y calidad de los embriones.



Munar y Nigro (1989), en Argentina, reportan su experiencia en 119 tratamientos superovulatorios en vacas y vaquillonas Nelore, Brangus y Brahman, en las cuales se usó Folitropin (**Folltropin, Biotay, Argentina**) en el ganado europeo. Los autores puntualizan la mejor condición de los embriones obtenidos, mayor porcentaje de embriones transferibles y mayor número de preñeces por tratamiento superovulatorio, al comparar con experiencias anteriores donde se usaron preparados con mayor contenido de LH.

Así pues resulta importante mencionar que en México, de lo poco en materia de biotecnologías reproductivas esta encaminado a especies de mayor tamaño (Vacas, Cerdas, Yeguas, Etc)., y las especies pequeñas como el conejo quedan solo a expectativas de laboratorios (Bioterios), y centros de investigación

En contraparte en las especies mayores, existen mas estudios lo que hace imprescindible el descubrimiento de las diferencias, Anatómicas, Fisiológicas, y comparativas entre las especies.

ANATOMIA.

EL APARATO REPRODUCTOR DE LA CONEJA.

Los órganos del aparato reproductor femenino son ovarios, oviductos, útero, cuello uterino, vagina y genitales externos.

Los órganos genitales internos (primero de cuatro componentes) esta sostenido por el ligamento ancho.

Este ligamento consta de mesoovario, que sostiene al ovario; el mesosálpinx, que sostiene al oviducto; y el mesonefros que sostiene al útero.

Ovarios, oviductos y útero son inervados principalmente por nervios autónomos. El nervio puduendo aporta fibras sensoriales y parasimpáticas a la vagina, vulva y clítoris.

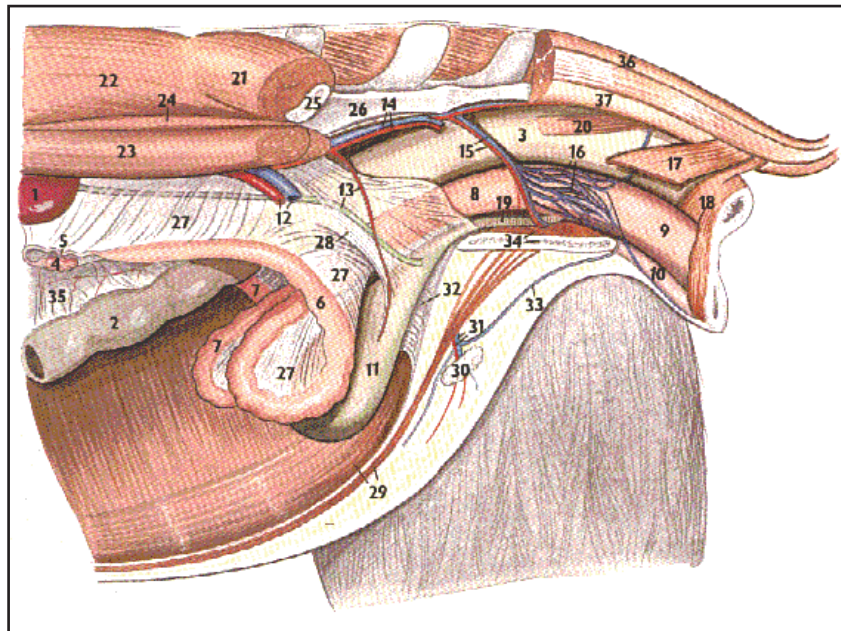


Fig. 1.0 Aparato genital de la hembra

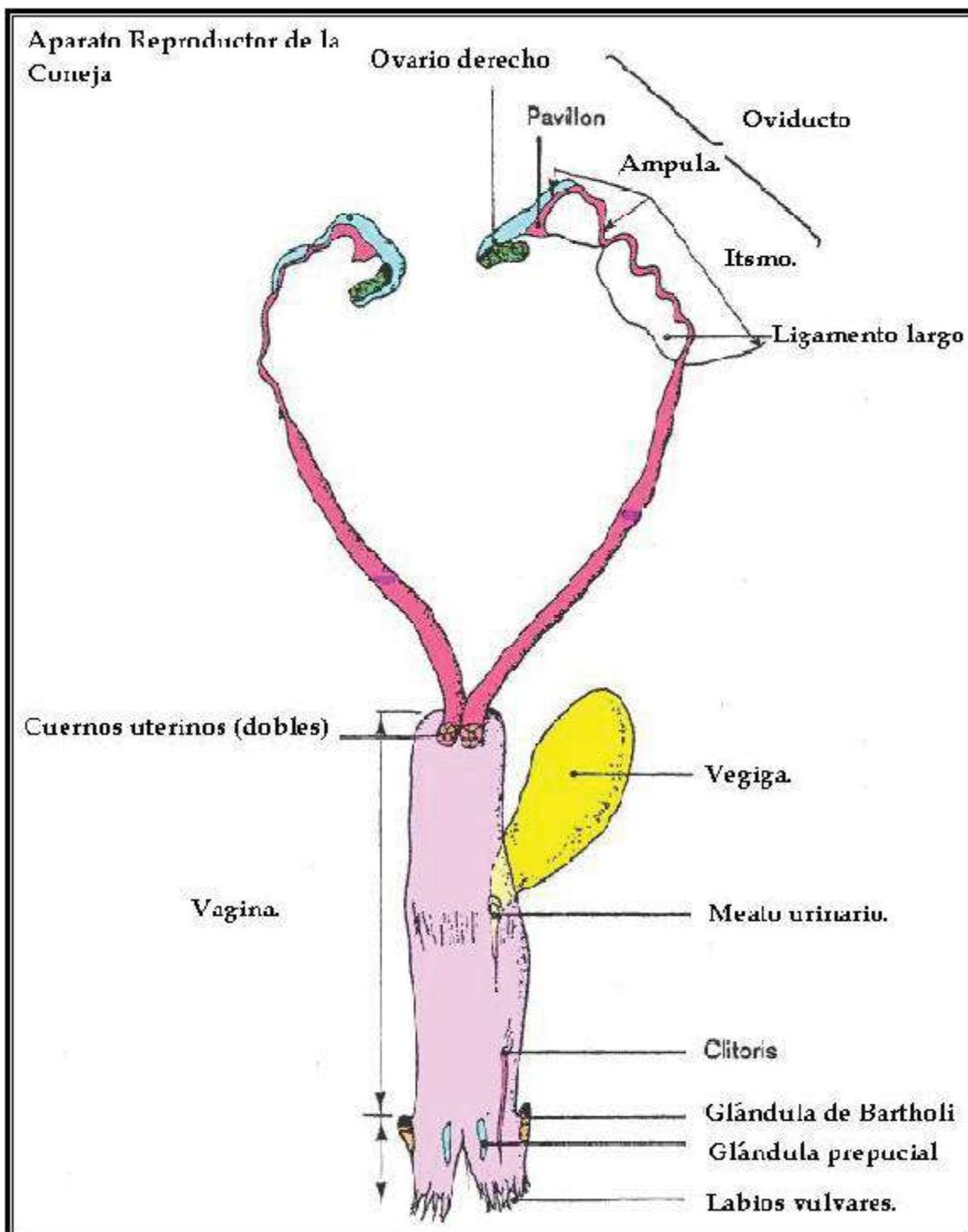


Fig. 1.1 Estructuras del tracto reproductor de la coneja, Vista dorsal.

EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román

OVARIO

El ovario a diferencia del testículo, permanece en la cavidad abdominal realiza tanto funciones exocrinas (Liberación de óvulos) como endocrinas (Esteroidogénesis).

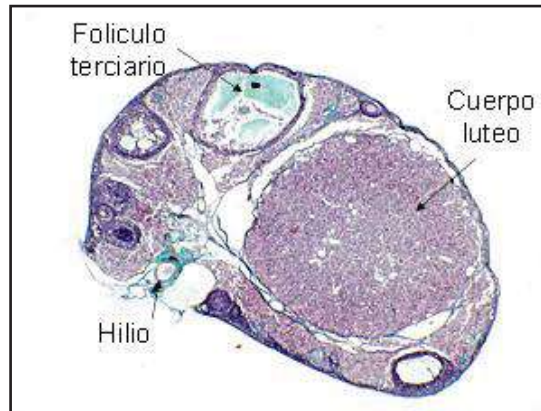


Fig. 1.2 Estructuras del ovario de la coneja.

El ovario, constituido por medula y corteza, está rodeado por epitelio superficial, comúnmente llamado epitelio germinal, la medula ovárica consiste en tejido conjuntivo (conectivo) fibroelástico donde se encuentran dispuestos en sistemas vascular y nervioso, el tejido conjuntivo de la corteza contiene muchos fibroblastos, algunas fibras de colágeno y reticulares y vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios y fibras del músculo liso.



Fig. 1.3 Arriba se muestra una figura del ovario de la coneja y de características propias del mismo donde se pueden observar la formación de los folículos primordiales, los folículos primarios y secundarios así como del epitelio ovárico.

Así pues cada una de las estructuras que complementan al sistema reproductor de la coneja tiene un grado de complejidad fisiológica así como los mecanismos neuroendocrinos que regulan los procesos de gametogénesis (ovogénesis y espermatogénesis) y es por ello que se deben conocer los mecanismos endocrinológicos que regulan a los ciclos sexuales y a los mecanismos hormonales que interactúan unos con otros.

El ovario contiene numerosos folículos compuestos por óvulos en desarrollo rodeados por una capa externa de células foliculares. Cada uno comienza la ovogénesis como ovocito primario.

Al nacimiento cada hembra posee el número de ovocitos en desarrollo para toda la vida, cada uno de los cuales esta en profase I. En el caso de las mujeres un ovocito secundario se libera cada mes desde la pubertad hasta la menopausia totalizando de 400 a 500 óvulos.

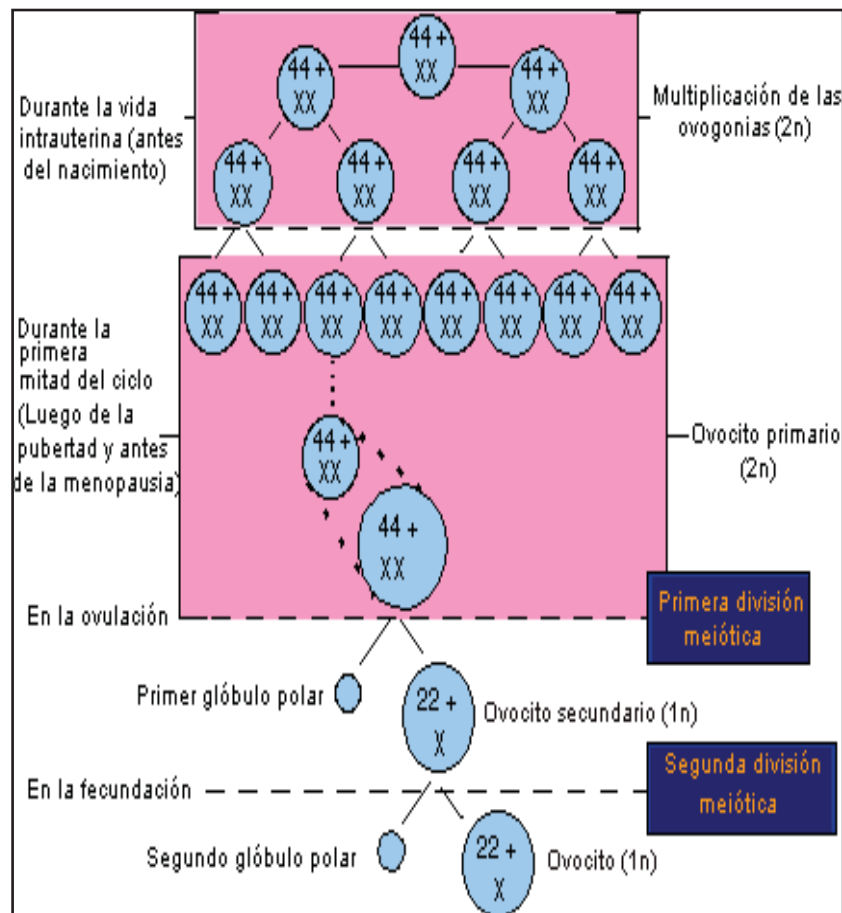


Fig. 1.4 Proceso de Meiosis características de las células germinales en el óvulo es llamado ovogénesis



FORMACIÓN DE LOS GAMETOS

El proceso de formación de los gametos se llama **gametogénesis** y tiene lugar en las gónadas.

Se habla de **espermatogénesis** cuando se trata de la formación de los espermatozoides y de **ovogénesis** si se refiere a óvulos, y aunque ambos procesos son en parte iguales, también existen ciertas diferencias.

De manera semejante a como sucede en la espermatogénesis, en la ovogénesis se distinguen varias etapas:

- **Periodo de proliferación:** se trata de la formación, por sucesivas mitosis, de numerosas células germinales denominadas ovogonias (células diploides), que son las células madres de los óvulos.
- **Periodo de crecimiento:** las oogonias aumentan de tamaño y se transforman en los **ovocitos de primer orden**, que son células diploides.
- **Periodo de maduración o meiotico:** el ovocito sufre la primera división meiotica y origina una célula llamada **ovocito de segundo orden** y otra menor, **corpúsculo polar** o **polocito**. Tanto el ovocito como el corpúsculo polar experimentan la segunda división meiotica, con lo que se forman en total cuatro células, todas ellas con una dotación haploide de cromosomas; un **óvulo** fértil y tres corpúsculos polares estériles que degeneran. De esta forma, se reduce el número de cromosomas, pero no las reservas nutritivas, que se concentran en una célula y facilitan su desarrollo, después de la fecundación.



En la ovogénesis no existe un periodo de diferenciación como en la espermatogénesis, ya que el óvulo que se forma después de la maduración apenas sufre modificaciones. No obstante, en algunas especies, hay una acumulación de cierta cantidad de sustancias nutritivas (**vítelo nutritivo**) en el citoplasma, y la formación de las envolturas terciarias en las aves y reptiles.

A diferencia de lo que ocurre en la espermatogénesis, la formación de los óvulos no es continua. En la especie humana, el periodo de proliferación y crecimiento de la ovogénesis se producen durante el desarrollo embrionario, de manera que los ovocitos de primer orden se rodean de las células foliculares y constituyen los folículos primarios del ovario. Se calcula que los ovarios de la mujer contienen unos 600 000 ovocitos de primer orden en el momento de nacer. Allí permanecen hasta la pubertad en que mensualmente comienzan a madurar varios de ellos, pero únicamente termina su maduración un óvulo.

Este proceso constituye el **ciclo ovárico**, que junto a las transformaciones que ocurren en el útero (**ciclo uterino**), ambos regulados hormonalmente, constituye lo que se conoce como **ciclo menstrual**. En otras especies, por el contrario, maduran uno o varios óvulos, una o varias veces al año.



Estructura del óvulo

Un **óvulo** o **huevo** es una célula menos diferenciada que el espermatozoide, formado por:

- El **núcleo**, conocido con el nombre de **vesícula germinativa**, que suele ocupar una posición excéntrica.
- El **citoplasma**, donde se acumulan las sustancias de reserva, generalmente en forma de gránulos de diversos tamaños, que reciben el nombre de **vítelo nutritivo**.

La distribución del vítelo no es homogénea, sino que alrededor del núcleo escasea. Por lo tanto, en el óvulo distinguen un **polo animal**, donde se halla el núcleo y en el cual se originará el embrión, y un **polo vegetativo**, donde se encuentra el vítelo que servirá de alimento al embrión.

- Las **envolturas** que protegen el huevo son varias y se clasifican en primarias, secundarias y terciarias.

La membrana plasmática de la célula huevo es la envoltura primaria y se denomina **membrana vitelina**. Está rodeada por las envolturas secundarias que tienen su origen en el ovario. Una es la **membrana pelúcida**, gruesa capa transparente de una sustancia glucoproteica, atravesada por multitud de canalículos, y otra, un conjunto de células del folículo que forman la **corona radiada**.



En reptiles y aves existen además unas envolturas terciarias provenientes de las secreciones de los oviductos, del útero o de las glándulas especiales, que se depositan alrededor del huevo después de que éste ha salido del ovario: son la **albúmina o clara**, las dos **cubiertas membranosas o fáfarras** y la **cáscara**.

Tipos de huevos

Según la cantidad y distribución del vítelo se distinguen varios tipos de huevos:

- **Alecitos, isolecitos u oligolecitos:** tienen escaso vitelo, uniformemente distribuido, y son de pequeño tamaño. Son propios de las especies en que el embrión no obtiene su alimento de reservas contenidas en el huevo sino del cuerpo de la madre (mamíferos), o del medio externo, al cual pasa tempranamente en forma de larva (cnidarios y equinodermos), etapa de su desarrollo antes de alcanzar su estado adulto.
- **Heterolecitos:** contienen mas vítelo que los anteriores y desigualmente distribuido, siendo mas abundante en el polo vegetativo. Ejemplo de ello son los huevos de lo anélidos, moluscos y anfibios.
- **Telolecitos:** el vítelo es muy abundante y ocupa casi todo el huevo, y el citoplasma puro se reduce a un pequeño casquete donde se encuentra el núcleo. Así sucede con los huevos de los reptiles, aves y muchos peces.
- **Centrolecitos:** tienen forma casi oval y el vitelo se acumula en el centro del huevo. El citoplasma rodea al vitelo y el núcleo se encuentra en el centro de la masa vitelina rodeado, a su vez, de una pequeña porción de citoplasma. Este es el caso de los huevos de los artrópodos.



FECUNDACIÓN

La fecundación es el proceso de unión de un espermatozoide y un óvulo, para formar una sola célula, el **cigoto** o **huevo fecundado**, que es la célula inicial del nuevo individuo.

Mecanismo de la fecundación

La fecundación implica una serie de procesos que en conjunto podemos resumir en los siguientes:

- **Penetración del espermatozoide en el óvulo:** se efectúa al azar pues depende de los encuentros casuales entre las células sexuales. Numerosos espermatozoides se acercan al óvulo gracias a su flagelo y se apelotonan a su alrededor, pero solo uno de ellos penetra, atravesando la membrana vitelina.

Tras el encuentro de las dos células sexuales, éstas se adhieren debido a que el óvulo presenta en su superficie (**fertilicina**), que actúa como receptora de los espermatozoides, que se combina con otra segregada por el espermatozoide (**antifertilicina**) provocando la adherencia entre los gametos.

En el óvulo de los mamíferos, tales receptores se localizan en la membrana pelúcida. En el punto en el que el acrosoma del espermatozoide toca la membrana del óvulo, se origina una prominencia (**cono de atracción**) en el que quedan englobadas la cabeza y pieza intermedia, pues la cola del espermatozoide queda fuera y se desintegra. El espermatozoide perfora la membrana del óvulo por medio de un enzima (**hialuronidasa**) que se cree elaborada a nivel del acrosoma.



- **Activación del óvulo:** cuando la cabeza y pieza intermedia ha penetrado en el óvulo, éste segrega una sustancia que se deposita por fuera de la membrana vitelina y forma una gruesa cubierta (**membrana de fecundación**), que impide la entrada de mas espermatozoides (los óvulos polipenetrados por mas de un espermatozoide no se desarrollan o lo hacen de manera anormal). En los óvulos de los mamíferos, la membrana plasmática del óvulo se funde con la de los gránulos corticales, orgánulo ricos en enzimas que se extienden bajo la membrana plasmática. La reacción provoca la expulsión de los enzimas granulares, que actúan sobre la zona pelúcida inactivando la sustancia receptora de los espermatozoides.

Además, en los óvulos de los animales superiores como los mamíferos, la segunda división meiotica se desencadena después de la penetración del espermatozoide, o sea, que el espermatozoide realmente penetra en el ovocito de segundo orden.

Fusión de los núcleos o cariogamia: el núcleo espermático (**pronúcleo masculino**), junto con el centríolo d la pieza intermedia se aproxima al núcleo del óvulo (**pronúcleo femenino**).

- Las membranas de ambos se reabsorben y se origina un núcleo en el que se reúnen los cromosomas paternos y maternos. Así queda constituido el **huevo fecundado o cigoto**. Por lo tanto, en el cigoto existe un número diploide de cromosomas formado por una serie haploide paterna y otra materna.

Posteriormente se inicia la primera división del cigoto con lo que comienza el desarrollo embrionario.

DESARROLLO EMBRIONARIO

EFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román



Una vez formado el cigoto, este se divide repetidas veces por mitosis y origina un nuevo individuo, O sea, cada ser pluricelular tiene su origen en una sola célula. El desarrollo de un ser vivo a partir de ésta célula inicial se denomina **ontogenia** (onto ser; génesis = engendrar) y abarca dos periodos embrionario y postembrionario.

El desarrollo embrionario comprende una serie de procesos que tienen lugar, desde que se forma el cigoto, hasta que el animal nace, es decir, sale del huevo o del útero materno.

En los animales **ovíparos**, el embrión se desarrolla fuera del aparato reproductor de la hembra y se nutre de las sustancias de reserva encerradas en el huevo; el periodo embrionario termina con la **eclosión** o rotura de las cubiertas del huevo y salida del animal.

En los vivíparos, el embrión se desarrolla dentro del aparato reproductor de la hembra, de la cual toma los alimentos necesarios, y el final del periodo embrionario viene señalado por el **parto**. Un caso intermedio es el de los ovovivíparos, pues aunque el embrión se desarrolla dentro de la madre, se nutre de las sustancias de reserva del huevo; el periodo embrionario también termina con la eclosión del huevo.

El desarrollo embrionario en los animales es un proceso continuo, pero para su estudio se suelen considerar tres fases: segmentación, formación de las hojas embrionarias y organogénesis.



Segmentación

Es la fase durante la cual el cigoto se divide mitóticamente en un cierto número de células (**blastómeros**), que forman una estructura embrionaria denominada **blástula**.

De todas formas, el proceso de segmentación es obstaculizado por la presencia de vítelo. Como la cantidad y distribución varía según los tipos de huevos, hay diversos tipos de segmentación, que en general son los siguientes:

- **Segmentación total (holoblástica) e igual:** propia de los huevos isolecitos en que todo el huevo se segmenta, con formación de blastómeros todos iguales. Así se origina una masa esférica de blastómeros llamada **mórula**.

A medida que se forman nuevos blastómeros, se sitúan en la periferia, con lo que dejan un hueco en el centro y se pasa al estado de **blástula (celoblástula)**, llamándose **blastocèle** a la cavidad central y **blastodermo** a la capa de blastómeros que delimita dicha cavidad. En la blástula de los mamíferos (**noduloblástula**), el blastocèle es excéntrico y existe un nódulo embrionario (masa de células) a partir del cual se forma el embrión.

- **Segmentación total (holoblástica) y desigual:** propia de los huevos heterolecitos. Se segmenta todo el huevo pero en la parte del mismo pobre en vítelo se forman blastómeros pequeños y numerosos (**micrómeros**), mientras que en la parte rica en vítelo se forman blastómeros grandes y menos numerosos (**macrómeros**). La mórula consta de muchos micrómeros en el polo animal y pocos



macrómeros en el vegetativo. En la blástula (**celoblástula**), el blastodermo es mucho mas grueso en el polo vegetativo pero hay blastocele. Si los macrómeros tienen gran volumen, la blástula (**estereoblástula**) es maciza y no existe blastocele.

- **Segmentación parcial (meroblástica) y discoidal:** propia de los huevos telolecitos. Solo se segmenta el polo animal, mientras que el resto, con abundante vítelo, no se divide constituyendo una reserva nutritiva para el embrión (saco vitelino, que contiene la yema del huevo) el cual se forma sobre esa masa vitelina. Se origina una **blástula (discoblástula)**, cuyos blastómeros se disponen únicamente en el polo animal, donde se forma un pequeño blastocele.

- **Segmentación parcial (meroblástica) y superficial:** propia de los huevos centrolecitos. Primeramente el núcleo se divide por mitosis sin división del citoplasma con lo que se forman varios núcleos que, a través del vítelo, emigran hacia la superficie y se distribuyen regularmente por la cubierta del citoplasma, la cual se divide por tabiques originándose los blastómeros. Se forma una **blástula (periblástula)** maciza porque la cavidad está ocupada por el vítelo, no hay blastocele.

En cualquier caso, la segmentación finaliza con la formación del estado embrionario **blástula**, con forma de esfera, llena o hueca, cuya pared (**blastodermo**) está constituida por una capa de células.

Pero para que se lleve todo este complejo desarrollo del embrión se debe conocer los mecanismos neuroendocrinos que regulan el ciclo de la hembra.

El ciclo ovárico comprende dos fases reguladas por hormonas. El folículo segrega estrógeno antes de la ovulación; el cuerpo lúteo segrega tanto estrógeno como progesterona luego de la ovulación.

Hormonas del hipotálamo y de la hipófisis anterior regulan el ciclo ovárico. El ciclo ovárico comprende los eventos en el ovario; el ciclo menstrual (en el caso de la mujer) ocurre en el útero.

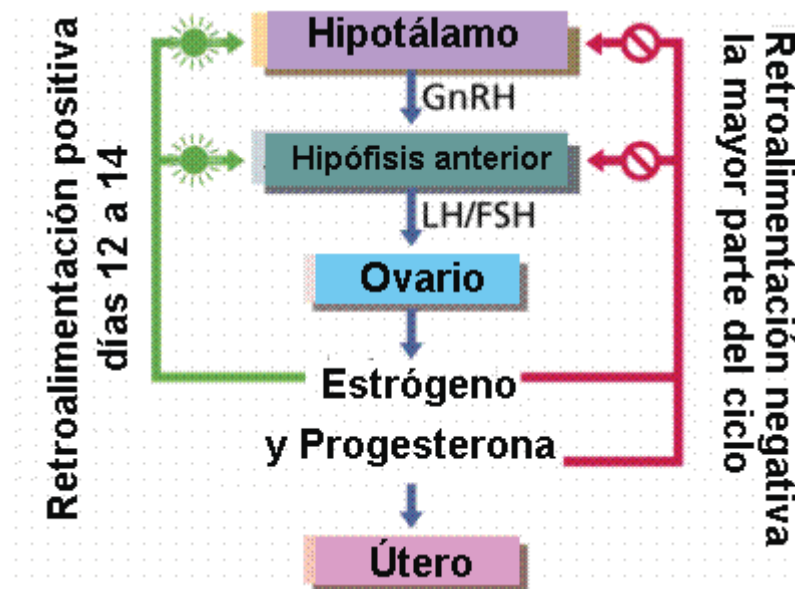


Fig. 1.5 interacción de las hormonas de la reproducción y si influencia de acción sobre otras de las hormonas o su inhibición.



Las hormonas FSH y LH se segregan, comenzando el ciclo ovárico. La FSH y la LH estimulan la maduración de un solo folículo en uno de los ovarios y la secreción de estrógenos.

La elevación del nivel de estrógeno en sangre produce la secreción de LH, que estimula la maduración del folículo y la ovulación. La LH estimula al folículo remanente a formar el cuerpo lúteo, que produce tanto estrógeno como progesterona. Enlace a una animación de la secuencia hormonal.

El estrógeno y la progesterona estimulan el desarrollo del endometrio y la preparación del endometrio uterino para la implantación del cigoto. Si no hubo embarazo, la caída de los niveles de FSH y LH hacen que se desintegre el cuerpo lúteo.

La caída de los niveles hormonales también causan la eliminación del endometrio necrotizado por una serie de contracciones musculares del útero.

Un ejemplo de ellos es el caso de las mujeres como se ejemplifica abajo.

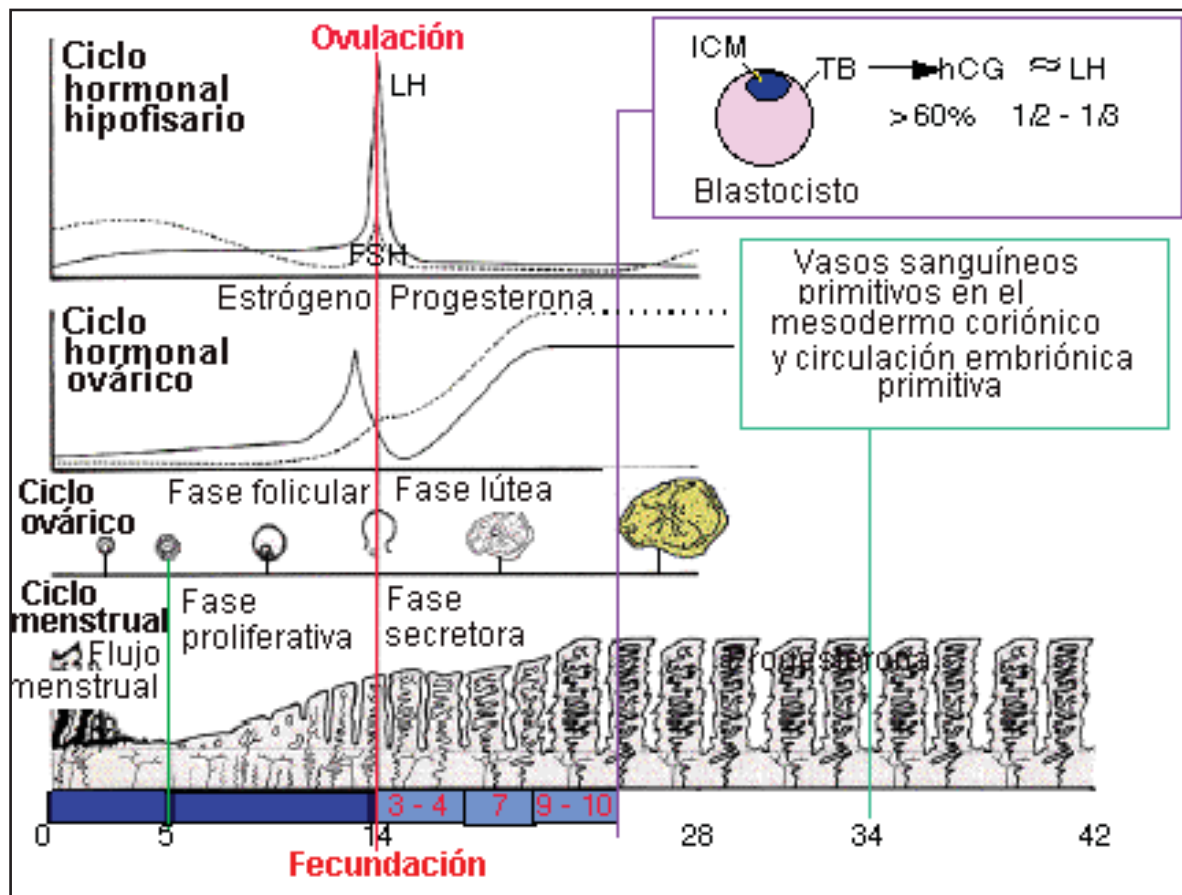


Fig.1.6 Ejemplo de los acontecimientos citados es la imagen de arriba pues puede observarse los cambios hormonales de cada uno de las etapas del ciclo sexual de la mujer.



ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

El GnRH es un decapeptido, (piro) Glu - His -Trp - Ser - Tir - Gli - Leu -Arg - Pro - Gli - NH₂, que es secretado por un pequeño número de neuronas encefálicas a la circulación portal, por la que llega a la adenohipófisis y libera LH y FSH por acción directa sobre los gonadotropos.

Al actuar sobre sus receptores específicos en la adenohipófisis ejerce variadas acciones, algunas bien caracterizadas mientras que otras no totalmente esclarecidas. Se conocen las acciones sobre la síntesis y secreción de FSH y LH, como también sobre la expresión de sus propios receptores.

Además, mantendría la integridad estructural y funcional de los gonadotropos

La neurona decapeptidérgica En el adulto los somas de la neurona GnRH se distribuyen difusamente a través de la base del cerebro anterior.

Un grupo, de 500 a 1000 neuronas, se organizan en un centro pulsátil, único, en la región basal del hipotálamo. Si bien cada neurona tiene una pulsatilidad intrínseca, propia, individual, todas ellas se coordinan en dicho centro, intercomunicadas como una red, para liberar GnRH a la circulación portal, sincrónicamente cada 45-60 minutos.

Sobre dicho centro actúan influencias centrales y periféricas que modulan la pulsatilidad del mismo.



Por ejemplo, hacia la mitad de ciclo menstrual y antes y durante el pico de FSH y LH, la frecuencia de descarga se acelera por la acción fundamental de los estrógenos. También sería de importancia la relación de la neurona decapeptidérgica con la glía y endotelio adyacentes.

La importancia de esta discreta red neuronal, que utiliza distintos neurotransmisores, es crítica para la regulación de la secreción de gonadotrofinas y consecuentemente para la gametogénesis y secreción gonadal, y debe considerarse en la práctica que todo fármaco que actúa sobre el sistema nervioso central puede, potencialmente, alterarla. Durante el desarrollo, las neuronas decapeptidérgicas son un caso único de migración centrípeta en el encéfalo, pues se originan por fuera del mismo en la placoda olfatoria.

Migran a través del primer par craneano hasta ubicarse, a aproximadamente la mitad de las neuronas migrantes, en la región hipotalámica.

Desde aquí envían sus axones al plexo portal primario. La otra mitad de neuronas GnRH se ubican en otras regiones, no llegando a tener terminaciones secretoras en el plexo portal; utilizarían al decapeptido como neurotransmisor o neuromodulador en circuitos neurológicos relacionados con la reproducción y la conducta sexual.

El origen de estas neuronas en la placoda, explicaría los hallazgos de los casos clínicos en los que, trastornos de la olfacción, se asocian con hipogonadismo como en el Síndrome de Kallman (Freeman 2000).



Receptores al GnRH

La primera acción del GnRH para ejercer su efecto en el gonadotropo, es reconocer y unirse con gran afinidad y especificidad a un receptor de membrana, el GnRH-R. Es éste una estructura de 328 aminoácidos en el humano, con variantes según la especie, y siete dominios transmembrana acoplados a la proteína G. El primer receptor hallado, GnRH I-R, carece de una región C terminal intracitoplasmática como se encuentra en otros receptores ligados a proteína G. También el tercer loop intracelular es relativamente corto. Ambas características son importantes para la internalización y desensibilización de los receptores que utilizan la proteína G.

En cambio, un receptor recientemente descrito en peces, anfibios y también en primates, el GnRH II-R, tiene una pequeña cola carboxílica citoplasmática y luego de su unión al GnRH II, se fosforila, internaliza y desensibiliza. En resumen, el hallazgo de variantes moleculares del GnRH en las diversas especies, más el distinto efecto del decapeptido según el tejido, llevó lógicamente a postular la posibilidad de más de un GnRH-R. Así se identificaron algunos de ellos en vertebrados, que difieren en el tercer loop extracelular y la cola intracelular, que podría distinguir entre las distintas variantes del péptido.

Se postula que un GnRH-R ancestral, dio origen a distintos receptores que evolucionaron en paralelo con sus ligandos. El GnRH-R se identificó primero en los gonadotropos adenohipofisarios.



Con el aislamiento del GnRH-R cDNA, la expresión de GnRH-R Mrna fue hallado en otras áreas como distintas regiones cerebrales y órganos tales como ovario, testículo y placenta. Experimentalmente se observó que en muchos órganos el efecto del GnRH inhibe la diferenciación y crecimiento celular. Esto se debería a la existencia de distintos receptores o cascada de segundos mensajeros, diferentes a la que emplearía el decapeptido en el gonadotropo.

Estas diferencias en el receptor GnRH y/o en el segundo mensajero según el órgano, tiene enorme importancia práctica pues abre la posibilidad de hallar análogos con efecto selectivo y exclusivo sobre un grupo celular. Nuevos estudios serán necesarios para precisar la importancia relativa de estos receptores en la fisiología reproductiva del humano, y los efectos farmacológicos de los análogos.

En cuanto al modelo tridimensional molecular del receptor, incluye la disposición hacia el exterior de un "bolsillo" hidrofílico determinado por la disposición de los loops, con cuatro lugares de interacción con el agonista, y que resulta de importancia para la unión de los fármacos.

El número de GnRH-R en la hipófisis es regulado por el estado endócrino. Aumentan justamente antes del pico pre-ovulatorio de gonadotrofinas y luego decrece. Su cantidad aumenta por la gonadectomía y decrece por los andrógenos, la preñez y la lactancia.



Muy importante es el efecto que ejerce el propio decapeptido sobre su receptor. La acción dependería de la concentración y frecuencia de los pulsos que llegan a los receptores. Así, se ha observado que la respuesta secretora es mayor ante un segundo pulso de GnRH que ante el primero, si los pulsos están separados por un tiempo definido.

A este efecto se lo denomina de *self-priming* o autopotenciación. A cantidades fisiológicas del péptido, se observa inicialmente una caída en el número de receptores (down regulation), con menor respuesta del gonadotropo. Esta fase primera es seguida por una segunda de aumento en el número de receptores (upregulation), pero que no implica un mayor sensibilidad del gonadotropo.

Esto se debería a que los gonadotropos responden cerca del máximo secretor, con sólo 20 % de los receptores ocupados. Concentraciones pequeñas, fisiológicas, del decapeptido estimulan la síntesis del receptor y lo mantiene a niveles fisiológicos, en cambio concentraciones altas y constantes provocan down regulation de los receptores y desensibilización de los gonadotropos, por complejos mecanismos como la internalización del complejo receptor- GnRH y modificaciones en los segundos mensajeros.



MADUREZ SEXUAL Y PUBERTAD

La pubertad llega cuando el conejo es capaz de producir óvulos o espermatozoides, aunque los conejos pueden intentar aparearse hasta dos meses antes de este estado de desarrollo.

La pubertad llega uno o dos meses antes de que el conejo alcance la madurez sexual, que es la edad a la que posee una capacidad de reproducción plena.(Sandford, 1988).

El inicio de esta etapa depende de la raza, la alimentación y el manejo. La edad de la aparición de la pubertad varía de la raza, así:

Razas pequeñas: 3-4 meses.

Razas medianas: 4-5 meses.

Razas gigantes: 8-9 meses.

Sin embargo, la presentación de la pubertad no significa que sea el momento propicio para el inicio reproductivo. (Centro de estudios agropecuarios, 2001).

Los factores más importantes que influyen sobre estas edades son el tamaño de la raza y la nutrición. Cuanto mayor es la raza más tarde llega la hembra a la pubertad.



Las razas más pequeñas son fértiles a los cuatro meses o poco más, mientras que las razas más grandes rara vez lo son antes de los siete meses. El animal bien alimentado se desarrollará mucho más rápidamente que otro de la misma raza mal alimentado.

Los animales domésticos nacidos al final del año suelen desarrollarse antes que los nacidos en primavera.

Esto puede ser debido a que los nacidos en primavera suelen estar sujetos a una disminución del nivel de nutrición, mientras que los nacidos al final suelen disfrutar de mejores condiciones en la época adecuada para el desarrollo sexual. (Sandford, 1988).

CICLO ESTRAL

Es el proceso fisiológico que regula las etapas fértiles e infértiles de la coneja. Estas etapas son:

*Anestro o ausencia de calor.

*Estro o calor.



Anestro o ausencia de calor es un periodo que se presenta los dos primeros y los dos últimos días del ciclo estral y que se reconoce por:

- ✓ La hembra no se deja montar.
- ✓ La vulva aparece fría y pequeña.
- ✓ La cercanía de otros conejos no le llama la atención.
- ✓ La hembra se ve tranquila. (Manual agropecuario, 1990).

La evidencia de que las hembras han alcanzado la madurez sexual es la presentación del celo; es decir, el momento en el que se acepta la cópula del macho. El celo tiene un rango de duración de 6 a 24 horas en zonas tropicales y subtropicales. En el hemisferio norte este periodo dura hasta 12 días. Los síntomas más evidentes del celo son:

- ✓ La hembra se muestra inquietas y se frota el lomo contra las paredes de la jaula.
- ✓ La vulva aparece roja, caliente e inflamada.
- ✓ La procura acercarse a las jaulas vecinas
- ✓ Micción frecuente.
- ✓ Sed y pérdida de apetito.
- ✓ Vulva inflamada Y con una coloración rosada. (Centro de estudios agropecuarios, 2001).



OVULACIÓN Y FECUNDACIÓN

La ovulación es la liberación de uno o más óvulos de los ovarios al oviducto. La ovulación en la coneja es inducida por la monta, ocurriendo aproximadamente 10 horas después de la misma.

La fecundación es el momento en que se unen los espermatozoides con los óvulos liberados. La fecundación ocurre 2 a 4 horas después de la ovulación y tiene lugar en el oviducto. En razas medianas, el número de óvulos viables varía de 1 a 20 y los óvulos fecundados entre 7 a 10. En razas pequeñas y gigantes estos valores son menores.

Entre los principales factores que impiden la fertilidad en una granja tenemos:

- ✓ Deficiente nutrición.
- ✓ Demasiado calor o demasiado frío por tiempos prolongados.
- ✓ Apareamiento temprano de las hembras, pues no han desarrollado completamente sus órganos reproductivos.
- ✓ Apareamiento tardío, ya que una vez completado su crecimiento, las hembras tienden a engordar, produciendo engrasamiento de los ovarios.
- ✓ Defectos en los órganos reproductivos de los animales. (Centro de estudios agropecuarios, 2001).



METODOS DE RECOLECCION DE EMBRIONES

La recolección de embriones para el desarrollo de tecnologías *in vitro* se puede realizar en dos formas:

- ✓ Recolección en animales *post-mortem*: Se pueden recoger por aspiración de embriones visibles o mediante el método de corte de la superficie e interior del ovario.
- ✓ Recolección en animales vivos: En animales vivos la recolección de embriones se puede realizar por aspiración trasvaginal guiada por ultrasonido y por laparoscopia / laparotomía.

RECOLECCIÓN DE OVARIOS EN ANIMALES POST-MORTEM.

La obtención de ovarios provenientes de vacas sacrificadas en el matadero suministra una fuente abundante de oocitos obtenidos a bajo costo provenientes de animales en diferentes estados del ciclo estral, que pueden ser madurados, fertilizados y cultivados *in vitro* hasta estados avanzados del desarrollo embrionario.

La recolección de embriones permite recuperar y aprovechar, lo que bajo condiciones fisiológicas normales no se lograría y con el fin de aprovechar al máximo el potencial genético de una donadora por procedimientos *in vitro*



Se deben evaluar los factores externos que están involucrados en la manipulación de los embriones antes de realizar el cultivo, ya que estos pueden afectar la expresión de la competencia del desarrollo.

La competencia de desarrollo se puede definir como la habilidad que tiene el oocito fertilizado de formar embriones hasta estados avanzados (blastocisto). Dentro de los factores externos que están relacionados con la manipulación de los ovarios, se encuentran la temperatura de almacenamiento de los ovarios, tracto reproductor y el tiempo de recolección de los embriones después del sacrificio.

La temperatura a la cual se deben transportar los ovarios y el tracto reproductor desde el matadero hasta el laboratorio, oscila entre 35 y 37°C. Se ha visto que temperaturas inferiores a los 30°C durante el almacenamiento de los ovarios producen pérdida de los productos de transcripción y hay lesión de las organelas a nivel citoplasmático, las cuales van a ser mediadores importantes de desarrollo embrionario temprano.

El tiempo de recolección de los embriones de los oviductos y trompas igualmente influyen en la competencia de desarrollo. Gordon y Lu (1990) reportan que los embriones pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30° - 37° C durante 8 horas sin llegar a afectar su calidad.

Los embriones provenientes de oviductos recogidos en el matadero se pueden obtener por dos métodos: 1.- método de corte de cuernos y 2.- el método de aspiración con jeringa en las estructuras superficiales mayores de 2 mm de diámetro.

1.- Método de corte:

El tracto reproductor se transportan al laboratorio en solución salina suplementada con antibióticos, a temperatura entre 35-37° C. En el laboratorio, se hace remoción del tejido adyacente (grasa) y estructuras del cuerpo lúteo y de sangre con lavados de solución salina y alcohol.

El método de corte consiste en colocar cada uno de los cuernos en cajas de petri que contienen el medio de cultivo y se corta la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de éste con cuchillas separadas por 2 mm

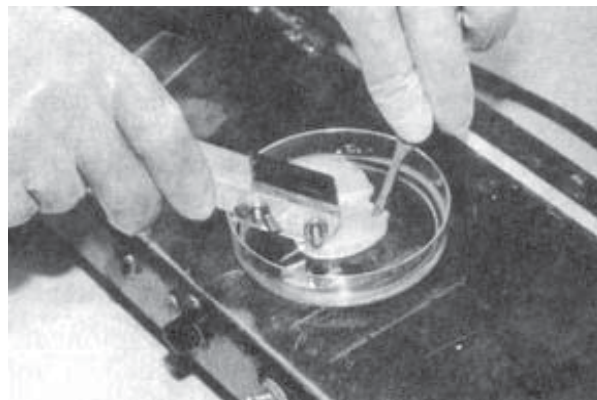


Fig. 1.7 se colocan en la caja de petrí, con medio y se parte el ovario para la extracción de los embriones.

Las técnicas que se mencionan abajo son establecidas para la recolección de ovocitos pero son aplicables para la extracción de ovocitos y serán mencionadas a continuación.

2.- Método de aspiración

Se someten a este procedimiento, folículos superficiales visibles de 2 – 5 mm de diámetro con jeringas de 5-10 cc y aguja calibre 18 G



Fig. 1.8 Procedimiento, folículos superficiales visibles.

Varios investigadores han comparado el método de corte y aspiración de folículos para evaluar el número de oocitos recuperados por ovario y la calidad de estos.

La recolección de oocitos proviene de animales vivos (animales jóvenes, vacas productoras de leche, vacas de carne) permiten incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora /año obtenidos por procedimientos in vitro.



	CORTE		ASPIRACION
	Carolan y col. (1994)	Hamano y Kuwayama (1994)	Lonergan y col. (1994)
No. Oocitos recuperados	44.2/13.9	63.3/22.1	18.7/14.6
Oocitos Tipo A (%)*	38.7/30.9	84.6/41.3	29/16
No. Blastocistos/ovario	3.3/0.96	3.6/1	

Tabla I de: Recuperación de oocitos por el método de corte vs. Aspiración comparación de resultados.

Los resultados indican que con el método de corte de folículos se obtiene una mayor proporción de oocitos y de excelente calidad (Tipo A) para estudios *in vitro* comparado con el método de aspiración.

La disminución en las tasas de recuperación y producción de embriones en el caso de aspiración folicular puede estar asociado a efectos nocivos sobre las capas de las células del cumulus ejercidas por la fuerza de aspiración.



Por otra parte, el mayor número de oocitos obtenidos por el método de corte puede estar explicado por la recuperación de oocitos provenientes de folículos menores de 2 mm de diámetro que están en el interior del folículo; sin embargo, Arlotto y col., (1996) sostienen que estos oocitos tienen poco potencial para sufrir maduración meiótica y desarrollo embrionario comparado con los oocitos recuperados de los folículos presentes en la superficie del ovario ya que los oocitos de folículos internos pueden no haber adquirido aún la competencia para la maduración y desarrollo.

Animales vivos

La recolección de oocitos proveniente de animales vivos (animales jóvenes, vacas productoras de leche, vacas de carne) permiten incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora/ año obtenidos por procedimientos *in vitro*; además, permite la disminución del intervalo generacional y establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia de producción de carne por inducción de preñeces gemelares.

Dentro de las técnicas que se han reportado para la recolección de oocitos bovinos se encuentran: laparotomía-laparoscopia y aspiración transvaginal guiada por ultrasonido.

Laparotomía / Laparoscopia

El desarrollo de la laparoscopia ha permitido avances en el diagnóstico y manejo de la fertilidad para incrementar la producción animal. Se ha utilizado para desarrollar la industria de transferencia en aquellas especies o grupos de edades en donde no es fácil realizar la manipulación del tracto reproductivo por vía rectal durante la recuperación de oocitos y/o transferencia de embriones.



Dentro de las ventajas que ofrece la laparoscopia se encuentra el bajo costo del equipo, la obtención de una imagen clara y un mejor control de problemas de recuperación post quirúrgico del ovario (6, 19).

Dentro de las desventajas que ofrece esta técnica se encuentran la no visualización de la cohorte de folículos que están en crecimiento debajo de la superficie ovárica, el desconocimiento de los efectos a largo plazo de recolecciones repetidas que pueden llegar a formar cicatrices y adhesiones en el sitio de operación y básicamente, el hecho de ser una técnica altamente invasiva por lo cual no es aceptada desde el punto de vista de bienestar del individuo.

Aspiración transvaginal guiada por ultrasonido

El ultrasonido ha sido utilizado como una herramienta en biotecnología para la aspiración de oocitos en bovinos por vía transvaginal.

Este procedimiento se puede realizar durante todos los estados del ciclo estral, durante el primer trimestre de gestación y aún en animales prepúberes. Este procedimiento se puede realizar una o dos veces a la semana durante períodos de 3 a 6 meses.

El primer método para discriminar entre oocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es la morfología del citoplasma y de las células del cumulus. La calidad de las envolturas celulares que rodean el oocito y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización in vitro

Para preparar los animales para la aspiración transvaginal, las vacas son sedadas. El recto es relajado con Detomidina (0.016 mg/Kg. IV) y se realiza anestesia epidural para prevenir las contracciones abdominales y así facilitar la manipulación de los ovarios. Se vacía el recto y se limpia la región perineal.

Para la técnica se utiliza un transductor de 5 ó 7.5 MHz que posee una aguja en la parte superior con punta ecogénica conectado a una bomba peristáltica de vacío que es introducido por vía vaginal. Se hace manipulación rectal de los ovarios y se colocan contra el transductor, se visualizan los folículos (mayores de 2 mm) y una vez localizados, la aguja atraviesa la pared vaginal y se recoge el aspirado folicular en tubos que contengan el medio de cultivo. En cada pasaje de la aguja se punciona solamente un folículo

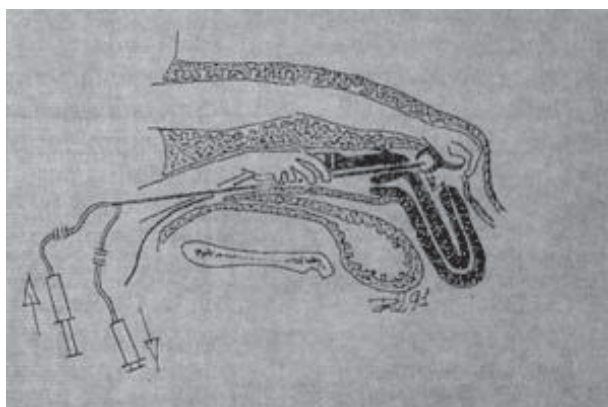


Fig. 1.9 Diagrama de aspiración transvaginal guiada por ultrasonido

Las ventajas de ésta técnica de recolección son su fácil utilización a nivel de campo, el menor riesgo para el paciente y su menor invasividad comparada con la laparoscopia.



Dentro de las desventajas que ofrece ésta técnica se encuentra el relativo elevado costo del equipo y la necesidad de personal capacitado para la punción.

Frecuencia de aspiración

La aspiración de folículos se puede realizar una vez por semana iniciando el día 3 ó 4 del ciclo estral que corresponde a la emergencia de la primera onda de crecimiento folicular. Sin embargo, se ha encontrado que el número de folículos aspirados y complejos cumulus-oocito (COC) recuperados es mayor cuando se realizan las aspiraciones 2 veces a la semana con intervalo de 3 ó 4 días.

Tabla II

Recuperación de oocitos por aspiración transvaginal
1 vs. 2 veces por semana (20)

Frecuencia de punción	1 vez/semana	2 veces/semana
No. Folic		
Aspirados/semana	25.3a	46b
No. COC	10.8a	18.8b
Recogidos/semana		

a b Valores en diferente columna con diferentes superíndice, significativamente diferente $P < 0.05$.

Se ha visto que con 2 aspiraciones a la semana, se produce un mayor número de embriones y de mejor calidad que con 1 aspiración a la semana, quizás porque los oocitos recolectados son sincrónicos en crecimiento y no provienen de un ambiente atrésico que podría existir con una aspiración a la semana por la presencia de un folículo dominante (7, 20).

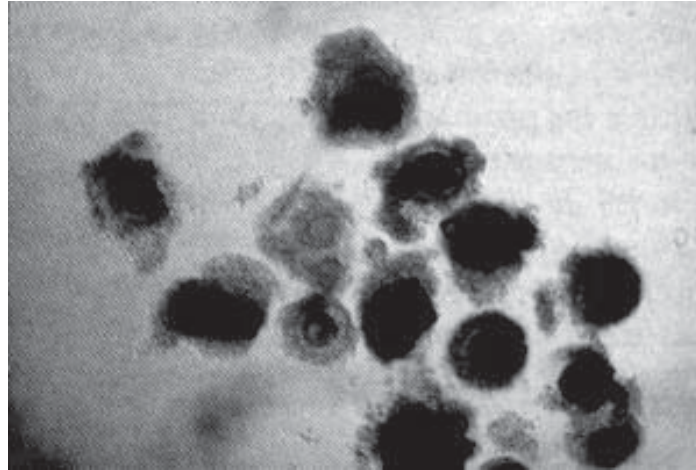


Fig. 2.0 Diferentes tipos de oocitos

Para obtener (complejos cumulus-oocito) COC de buena calidad durante la aspiración transvaginal se debe tener en cuenta la relación entre el diámetro de la aguja y la presión de aspiración. En bovinos, los folículos han sido aspirados con agujas de 18-22 G, jeringas de 5-20 ml y presión de vacío de 75-100 mm HG.

Las mayores tasas de recuperación se obtienen con agujas más gruesas (18G) independiente del vacío de aspiración. Se ha visto que la presión de vacío ejercida durante la aspiración afecta no solo la tasa de recuperación de recuperación de oocitos, sino también la calidad de estos. Incrementos en la presión de vacío aumenta el número de oocitos recuperados, pero a la vez se disminuye el número de oocitos viables, posiblemente por la pérdida de las células del cumulus que rodean al oocito.



Efectos de la aspiración transvaginal a nivel ovárico

La mayoría de investigadores no han encontrado ningún tipo de adhesiones o anormalidades en el tracto genital y ovarios. Solamente han reportado un leve endurecimiento de los ovarios debido a incrementos en el número de fibras de colágeno en la túnica albugínea. Sin embargo, las altas tasas de preñez obtenidas con estos animales después del tratamiento indican que el daño es leve, sugiriendo que no se produce ningún daño irreparable a nivel ovárico con la aspiración transvaginal (15, 18).

Efectos de la aspiración transvaginal sobre el ciclo estral

Cuando los animales son sometidos a una aspiración por semana el celo se presenta normalmente cada 19-22 días, hay formación de cuerpo lúteo 3 a 5 días después del celo, aunque pueden haber compromisos de los niveles de progesterona plasmática.

Cuando se realizan 2 aspiraciones por semana con intervalo de 3 a 4 días, se inhibe el desarrollo de un folículo dominante y se detiene la ciclicidad debido a la ausencia de ovulación, que puede presentarse como consecuencia de la permanente manipulación del ovario y a la pérdida de fluido folicular durante la aspiración. Sin embargo, si el intervalo de aspiración es mayor de 5 días el animal puede ovular y desarrollar cuerpo lúteo.



Recolección de oocitos en animales prepúberes

La presencia de ondas foliculares en terneras y la habilidad para estimular el desarrollo folicular ofrece la posibilidad de utilizar animales jóvenes como fuente de oocitos; sin embargo, las principales limitaciones para desarrollar la técnica de aspiración transvaginal en animales prepúberes con la carencia de un diseño adecuado de transductor para el ultrasonido y la inhabilidad de inmovilizar manualmente los ovarios por vía rectal; por lo tanto, la técnica más utilizada para recuperar oocitos en este grupo de animales ha sido la laparoscopia/ laparotomía.

Una etapa crítica en el procedimiento de *Fertilización in vitro* (FIV) consiste en la evaluación morfológica de los oocitos para determinar su potencial fertilizante.

Comercialmente, la aspiración de oocitos para la producción in vitro de embriones le puede permitir a los productores generar un elevado número de embriones de sus mejores vacas aún cuando sus animales sean viejos o presenten patologías del tracto reproductivo que influyan sobre su fertilidad.

Morfología

El primer método para discriminar entre oocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es la morfología del citoplasma y de las células del cumulus. La calidad de las envolturas celulares que rodean el oocito y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización *in vitro*.



Las células del cumulus son subpoblaciones de células de la granulosa las cuales proveen de nutrientes al oocito durante el crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del oocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización.

Cada laboratorio establece un tipo de clasificación para los oocitos recuperados que se van a someter a procedimientos *in vitro*.

Los oocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma según se observa en la tabla 4. De estas categorías en general se considera que solamente los oocitos tipo A y B poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por FIV.

Finalmente, la técnica de recolección de oocitos combinada con la producción *in vitro* de embriones puede llegar a convertirse en una alternativa potencial a los procedimientos convencionales de superovulación y producción de embriones *in vivo* en el momento en que por éste método se produzcan una mayor cantidad de embriones transferibles en períodos más cortos de tiempo sin la utilización de hormonas y sin efectos nocivos sobre la salud y fertilidad animal.

Comercialmente, la aspiración de oocitos para la producción *in vitro* de embriones de sus mejores vacas aún cuando sus animales sean viejos o presenten patologías del tracto reproductivo que influyan sobre su fertilidad.

**Tabla III**

Categorías de complejos Cúmulos Oocito (COC) para procedimientos de FIV

A	Capas múltiples, compactas de células de cumulus (> 4)	Homogéneo y transparente
B	Capas múltiples de células de cumulus (1-3)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
C	Denudados	Irregular con zonas oscuras
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Igualmente, esta técnica ofrece la posibilidad de ser utilizada en animales jóvenes con el fin de disminuir el intervalo generacional y por último, permite la recuperación de oocitos de animales recién sacrificados de alto valor genético con el fin de producir una última descendencia.

Desde el punto de vista científico, estas técnicas constituyen la base para el desarrollo de nuevas tecnologías como la clonación y sexaje de embriones y la producción de animales transgénicos.



CRIOCONSERVACIÓN

La criopreservación es la técnica de conservación de material genético que se aplica manteniendo los embriones a menos de -130°C → punto donde el material embrionario queda parado. Deberá ser reversible y que se mantenga la integridad celular.

La finalidad es la de separar en el tiempo la obtención de los embriones y su transferencia → mantenimiento indefinido. Se dice que su viabilidad sólo se afecta por las radiaciones ambientales y, por lo tanto, se piensa que puede aguantar sin problemas durante siglos.

El cultivo *in vitro* o *in vivo* no para el material embrionario y, por lo tanto, no permite el mantenimiento indefinido.

La refrigeración entre 0 y 4°C permite mantener los embriones unas horas. No es una técnica todavía efectiva del todo. Funciona muy bien en rumiantes → viabilidad de embrión criopreservado es muy parecido a la del embrión fresco (50-60%). Pero no es siempre como el cerdo.

Como más joven es el embrión, más difícil es que supere la criopreservación y, por lo tanto, más frecuentemente blastocisto. La excepción se da en ratón y conejo, ya que todos los estadios son resistentes a criopreservación.

La criopreservación está limitada por el éxito de la superovulación y recuperación del embrión (si no se hacen no tenemos embriones para criopreservación).

EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román



APLICACIONES Y VENTAJAS DE LA CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONARIA.

MANEJO

La recuperación de embriones es muy variable. La sincronización es un proceso que cuesta dinero en fresco porque no se sabe el número de embriones que se tendrán.

La crioconservación permite preparar las receptoras concretas, permite hacer transferencias seriadas y partos de forma progresiva. Se aprovechan los ciclos naturales después de 6 días de la ovulación. También se puede predeterminar el parto porque al ganadero le conviene por diferentes motivos.

Puede hacer que se predetermine las hembras que se usan para parir y las que se usan como madres adoptivas.

La zona pelúcida siempre se debe mantener entera para evitar que los microorganismos contacten con las células embrionarias.

Los problemas legales son muy bajos.

La crioconservación permite una selección genética más intensa. Se usa una madre que se superovulaciona y se potencia la selección vía paterna y materna con el semen y oocitos.



BANCOS DE EMBRIONES

Tienen importancia genética. Se intentan hacer en animales en peligro de extinción para mantener la diversidad genética. No se puede perder las razas autóctonas. También se usa como un control de los métodos de selección genética. Se aplica una línea de selección genética.

Es un seguro biológico por si aparece una epidemia que acaba con alguna raza concreta.

CLONACIÓN Y SEXAJE

Junto a la crioconservación tiene una gran selección. Sirve para poder transferir lo que nos interese.



INVESTIGACIÓN Y CRIOBIOLOGÍA

Dividiendo una mórula se tiene dos individuos iguales que permiten estudiarlo. Además, sirve para estudiar como crioconservar los órganos.

INCONVENIENTES O DESVENTAJAS

Asociados a la superovulación de embriones y transferencia de embriones porque hay una variabilidad muy grande a la respuesta superovulatoria.

Siempre que las condiciones de manejo no son idóneas, se conduce al fracaso. Sólo en aquellas explotaciones donde el manejo es correcto.

Hay mucha variabilidad de los animales en el número de embriones. No se debe diseñar erróneamente una explotación que tenga la misma genética porque puede eliminarse fácilmente.

Los costos son elevados. El coste inicial es caro, pero el mantenimiento no. La variabilidad de resultados es muy alta. Hay muchas explotaciones en los que estos resultados no son muy buenos.

REACCIÓN DEL EMBRIÓN A BAJAS TEMPERATURAS

La ciencia que lo estudia es la criobiología (procesos a bajas temperaturas). Los embriones están formados por más de un 80% por agua. El propio embrión es una solución acuosa disuelta en esta agua de las células.



Separada de otra solución acuosa extracelular por una membrana celular parcialmente permeable. Cuando se pone en medio líquido hay una reacción entre una solución acuosa intra y extracelular. Si el ambiente extracelular es hiperosmótico, el embrión perderá agua. Los embriones tienen capacidad de responder osmóticamente.

Si se pone un medio hiperosmótico, se deshidrata porque sale agua a compensar la solución acuosa. Se puede decir que el embrión tiene unas propiedades coligativas (tiene una presión osmótica determinada aproximada de 300 msm), como es agua más solutos, tiene un punto de congelación (temperatura a partir de la cual congela), punto eutéctico (temperatura a la que pasa de ser líquido a sólido de forma progresiva).

Comienza a congelarse a -7°C pero no se vuelve sólido hasta -20°C . La más importante es la capacidad de respuesta osmótica. También se debe entender que entre el ambiente intracelular y extracelular hay un transporte de agua y de calor o frío (siempre del ambiente extracelular hacia el intracelular).

El destino del agua intracelular de un embrión $\rightarrow$ si todo el agua congela, morirá. Se debe conseguir que el embrión se deshidrate para evitar que se congele dentro del embrión. Está afectado por otros factores.

Evitando que el 40% del agua se congele, es suficiente. Si se consigue una pérdida de agua total, también lo mataríamos. Tampoco se debe hacer de golpe, porque también lo mata. No se puede hacer una deshidratación brusca o directa. Debe ser gradualmente.



Se consigue gracias a la capacidad de respuesta osmótica del embrión y bajando la temperatura de forma progresiva para que pierda agua intracelular lentamente. Cuando se disminuye la temperatura acuosa, primero congela el ambiente extracelular. Si un ambiente se congela, forma cristales de hielo.

El resto del agua está hiperosmótica e incrementa la presión osmótica del ambiente extracelular. Provoca que el ambiente extracelular esté hiperosmótico y el embrión pierde agua según si es brusco o progresivo. Si se hace progresivamente, hay un equilibrio entre la temperatura y la pérdida de agua. Cada vez se irá perdiendo más agua. Los cristales buscan núcleos para perderse. Con el ambiente intracelular y extracelular pasa igual. El ambiente extracelular cada vez queda más hiperosmótico.

Parando el enfriamiento hasta -80°C , habría suficiente porque se habría perdido la mayoría del agua del embrión. Debe ser lento. Se hace disminuyendo la temperatura $0'2^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$. Así se asegura que pueda responder osmóticamente perdiendo agua. Así, la viabilidad es máxima. Si los cristales de hielo son muy grandes, la supervivencia es leve.

Cada tipo celular tiene una tasa de enfriamiento óptima. Son células muy grandes. A mayor es la célula, más alta es la tasa de enfriamiento que se debe aplicar.



En eritrocitos se puede llegar hasta los 1000°C / minuto de congelación porque su tamaño es pequeño y tiene muy poca cantidad de agua total.

- Un linfocito tiene un óptimo de 10°C / minuto.
- La tasa de enfriamiento está en función del tamaño.

Las causas que pueden provocar su muerte son:

Formar mucho hielo intracelular. Sobretudo importante porque tiene una tasa de congelación demasiado rápida. No hay equilibrio entre la pérdida de temperatura y equilibrio osmótico.

Tampoco se debe aplicar una tasa de congelación muy baja para evitar que se deshidrate totalmente. Si pierde toda el agua, da deshidratación, llega a un volumen de no retorno y no puede recuperar su volumen inicial. El ambiente extracelular cada vez será más hiperosmótico y puede llegar a ser tóxica para el embrión.

Planos de fractura de los cristales de hielo que son cortantes. Si el cristal crece cerca del embrión, puede romper el embrión. No se puede transferir ningún embrión sin la zona pelúcida íntegra.



ETAPAS DEL PROCESO DE CRIOCONSERVACIÓN

Hay 6 etapas:

Embriones deben perder agua progresivamente. Además, también deben contactar con sustancias crioprotectoras. Protegen estabilizando la membrana (Dimetilsulfóxido (**DMSO**), glicerol). Además, también bajan el punto de congelación del embrión.

1.- Enfriar el embrión asegurándose que el medio extracelular congela de forma segura → inducción de cristalización extracelular añadiendo cristales de hielo a $-5/-7^{\circ}\text{C}$.

2.- Enfriar el embrión de forma lenta y progresiva a $-0'2^{\circ}\text{C}$ / minuto a $-0'5^{\circ}\text{C}$ / minuto con aparatos caros hasta -40°C . Puede durar hasta 3 horas. Tienen una capacidad limitada. En bovino, sólo un embrión / pajita.

3.- Se almacena a -196°C en N_2 líquido de forma indefinida. La temperatura de la fase líquida es económica para tener bajas temperaturas porque es una forma fácil de tenerla.

4.- Se debe descongelar cuando se quiere usar. La tasa de descongelación depende mucho de la temperatura a la que se paró el enfriamiento. Si se paró a -80°C , la descongelación debe ser lenta para que pueda recuperar su volumen de forma lenta y progresiva.



5.- se para a -40° C, se sabe que hay muy pocos cristales pequeños intracelulares que no matan el embrión y se debe aplicar una descongelación rápida para que crezca por nucleación y evitar que puedan crecer los cristales dentro del embrión.

6.- Se debe eliminar el crioprotector dentro del embrión. Hoy día se están descubriendo procedimientos que rompen con el enfriamiento lento y progresivo. El método convencional es de equilibrio. Los métodos de no equilibrio o vitrificación exponen los embriones a unas concentraciones de solutos tan altas que cuando se disminuye la temperatura, la viscosidad es tan grande que no cuenta, sino que vitrifica hasta que queda sólido sin cristalizar → las moléculas quedan paradas sin cristalizar.

Los cristales tienen las moléculas organizadas y no son transparentes. Se consigue una solidificación sin formar cristales. Permiten una alta viabilidad, incluso para embriones muy sensibles a la manipulación.

Permite pasar de temperatura ambiente a N_2 líquido. Es un proceso muy rápido. La viabilidad más o menos es igual que la convencional.



▪ HIPOTESIS

- Se cree que al aplicar GnRH accionaremos los mecanismos de liberación de LH y FSH con ello lograremos inducir a la coneja a la producción y maduración de más óvulos de los que ya produce.
- Las conejas superovuladas aceptaran al macho por la cantidad de hormonas circulantes en su organismo que han ejercido a la superovulación.
- El DMSO como criopreservador de células es capaz de criopreservar a los embriones y para almacenarlos en nitrógeno líquido.
- La calidad de los embriones será superior en cantidad y calidad así como la eficiencia reproductiva de las conejas superovuladas.



OBJETIVOS

Generales

- Establecer una alternativa para las granjas para aumentar la producción de número de gazapos, apoyados en los estudios de fertilización y también el estudiar la mecánica de las biotecnologías reproductivas.
- Determinar y comprobar que la GnRH es un método alternativo para la superovulación al ya establecido con PMSG así como el estudiar el mecanismo endocrino de la reproducción a la maduración de los folículos.

Específicos

- Realizar una constratastación entre los 2 tratamientos superovuladas y el control negativo y de los embriones recopilados se evaluarán para determinar la conveniencia del tratamiento en calidad y cantidad, de embriones producidos por cada grupo de conejas.
- Aprender el manejo de animales de laboratorio y sus aplicaciones en biotecnologías reproductivas como los tratamientos hormonales.



MATERIAL Y MÉTODOS.

Localización.

El presente trabajo se encuentra ubicado en el Sector cunícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en las instalaciones de la posta Zootécnica, que se encuentra localizada en el Mpo. de Tarímbaro Michoacán la cual tiene la siguiente descripción.

Localización

Se localiza al norte del Estado, en las coordenadas 19°48' de latitud norte y 101°10' de longitud oeste, a una altura de 1,860 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Copándaro y Cuitzeo, al este con Alvaro Obregón, al sur con Morelia y Charo, y al oeste con Chucándiro. Su distancia a la capital del Estado es de 12 kms.



Fuente INEGI 2000: Enciclopedia de los Municipios de Michoacán© 2000.Centro Estatal de Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Michoacán

EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román



Extensión

Su superficie es de 258.57 km² y representa el 0.43 por ciento del total del Estado.

Orografía

Su relieve está constituido por el sistema volcánico transversal y los cerros Tecolote, de Oro, de Tlacuache y la calle de Tarímbaro.

Hidrografía

Su hidrografía está constituida por el río San Marcos, arroyos, manantiales de agua fría, represas y parte del lago de Cuitzeo.

Clima

Su clima es templado con lluvias en verano. Tiene una participación pluvial anual de 609.0 milímetros y temperaturas que oscilan de 2.5 a 25.1° centígrados.

Principales ecosistemas

En el municipio domina la pradera, con nopal, huisache y matorrales diversos. Su fauna se conforma por coyote, tejón, zorrillo, tlacuache, conejo, liebre, gorrión, codorniz y golondrina.

Recursos naturales.

La superficie forestal no es maderable y está ocupada por matorrales espinosos.



Características y uso del suelo.

Los suelos del municipio datan de los periodos cenozoico, terciario, cuaternario y plioceno; corresponden principalmente a los del tipo chernozem. Su uso es primordialmente agrícola y en menor proporción ganadero.

PERIODICIDAD DEL PROYECTO.

El presente proyecto se llevo a cabo en el periodo Comprendido entre los meses Noviembre del 2004 a Diciembre del mismo año y cada una de las actividades realizadas fueron esclarecidas en el cronograma de actividades ya establecido.

MATERIAL BIOLÓGICO

Los animales utilizados fueron 10 conejas de la raza Neewzelad White (Nueva Zelanda Blanco), las cuales fueron seleccionadas del sector cunícola del área de engorda, de acuerdo al cronograma de actividades establecido.

También se utilizaron sementales del sector para las cruzas de las conejas, los sementales son pertenecientes a las razas manejadas en el sector, se hace mención con más detalle en los cuadros del control de montas.

La hormona utilizada, para el protocolo de superovulación fue **FERTAGYL® INTERVET, MEXICO**. La cual es un equivalente de la hormona de liberación de gonadotropinas (GnRH), y fue utilizada como tratamiento de superovulación en la especie cunícola.

**EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)**

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román



Para continuar con la descripción de los materiales utilizados haremos mención de cada uno de ellos de acuerdo a la secuencia de actividades.

Para la selección de las conejas a utilizar se requirió de 5 jaulas tipo americano con dimensiones de (90X60X40) propiedad del CMEB (Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología) para albergar a 2 conejas cada una de ellas, de las cuales fueron flameadas y desinfectadas, así mismo los comederos de tolva y bebederos de chupón, para albergarlas posteriormente, fueron separadas necesitando de 5 jaulas más repitiendo el proceso de desinfección, y a las 2 semanas después se procedió a realizar el pesaje de las hembras, para determinar su madurez de acuerdo al peso, obteniéndose la 1^{era} Tabla de pesos contenida en los anexos, para lo cual se requirió de una balanza de pesas perteneciente del sector marca OKEN con capacidad para 20 Kg.

El alimento suministrado a las conejas fue CONEJINA “N” el cual es perteneciente a la casa comercial purina y cuya etiqueta y descripción de los análisis esta especificado en la parte de anexos.

Se realizó de acuerdo cronograma de actividades el 2^{do} pesaje de las conejas, para determinar su madurez sexual al peso, y se dio el Vo. Bo para la segunda etapa del experimento.



2DA ETAPA.

La cual consistió en la aplicación de 0.2ml de la hormona GnRH (**20µg, Fertagyl® Intervet, México.**) por la vía intramuscular, para posteriormente después de la aplicación las hembras fueron cubiertas por el macho, se hicieron 2 tratamientos como se indica en el control de montas descrito en el área de anexos, además se repitió la monta, una monta a las 10:00 de la mañana, y una monta a las 5:00 de la tarde como se especifica en la tabla de el control de montas.

Después de las 48 hrs. de la monta se precedió al sacrificio de las hembras por el método de desnucamiento manual, para lo cual se requirió del equipo de matanza como cuchillos victorinox y chaira para afilar, se procedió al corte de la yugular y al , corte de extremidades (posteriores y anteriores así como de la cola), desprendimiento de la piel, se procedió la fractura de la zona pélvica, corte con escarpelo de los ligamentos suspensorios del aparato reproductor como se especifica en los anexos, para de ahí se extraer el tracto reproductor después eviscerado así como de la coneja se coloco en bolsas de plástico que contenían 350 ml. de PBS (**Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma BioSciences**) y ser transportados a el CMEB donde se continuaría el proceso.



En el centro multidisciplinario de estudios en biotecnología, se procedió al retiro del tejido adiposo, se requirió de Etanol al 70 % para desinfectar la campana de flujo, mechero de busén así como de instrumental quirúrgico del cual se hará una descripción de material utilizado: Tijeras de mayo, así como Tijeras de Metzenbaum, Pinzas de Rochester -Pean, Pinzas de Ochsner, Pinzas de Kelly, Pinzas de mosquito de Halsted y de la utilización de una campana de flujo laminar (LABNCO) y de cajas de petrí (SIGMA) para la remoción de los tejidos grasos.

El tracto reproductor fue tomado con las pinzas curvas de y con las pinzas de dientes de ratón y se removió el tejido con ayuda de las tijeras curvas, para después ser colocados en las cajas de petrí, previamente llenadas con PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma Bio Sciences) y así realizando la remoción de todos los tejidos.

Así después en el área del quirófano, con ayuda de agujas Luer Lock 1.60 x 35 mm 15 G x $\frac{1}{3}$ sin punta, se hizo también un corte trasversal en los cuernos uterinos para después introducir una aguja y ser armada una jeringa con 5ml de PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma Bio Sciences) para el lavado canulado de los cuernos uterinos y al ser colectados en tubos falcón para ser centrifugados a 20 000 RPM LEC/ CENTRAL GP8 x 6:00 minutos a 10 ° C.



El sobrenadante (la fase acuosa) se tira y la pastilla se recupera y se resuspende en 25 ml de PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma Bio Sciences) y se centrifuga a 20 000 RPM x 6:00 minutos a 10 ° C y el sobrenadante (la fase acuosa) se tira y la pastilla se recupera y se resuspende en 5 ml de PBS y se limpia con Hialurunidaza (Bio Select), para romper las células del cúmulos de granulosa,

Y poder ser observados en un microscopio invertido (ZEISS GERMANY) y se evaluaron las cantidades y calidades de embriones de las hembras superoovuldas y no superovuladas, como se especifica en el área de Resultados. Se procedió a congelar a los embriones con DMSO de (SIGMA BIOSCIENCES) y se congelaron en el ultra congelador REVCO .



MATERIALES PARA LA ELABORACIÓN.

Para la elaboración del presente trabajo se requirió del siguiente material, tanto biológico como espacios físicos, así como material de distinta índole como se describe abajo y se detalla cada una de los elementos utilizados.

Espacios Físicos:

Biblioteca.

Sector Cunicola.

Sector de Carnes.

Laboratorio (CMEB)

Sala de cómputo.

Material escrito:

Artículos de publicación científica.

Tesis.

Libros.

Revistas.

Artículos de divulgación publica (Internet)



Material para la elaboración:

P. C Hewlett Packard (Windows xp, Disco duro de 60 Gb, Procesador Intel incide Pentium 4, memoria en Ram de 256 kps Office xp, procesador de palabras Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Power Point con acceso a Internet Prodigy Infinitum velocidad de 512 kps.)

- ✓ Resúmenes previos.
- ✓ Impresora Hewlett Packard 640 C.
- ✓ Hojas blancas marca Hewlett Packard.
- ✓ Pastas y Engargolado.



RESULTADOS

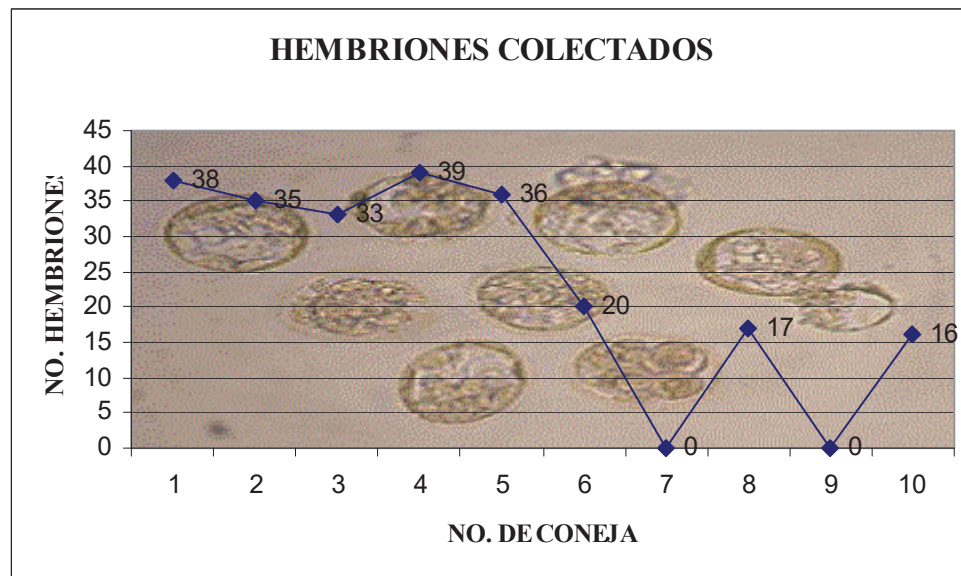
Las expectativas a cumplir durante el trabajo se cumplieron como se esperaban y los resultados se expresan de la manera siguiente:

EMBRIONES RECUPERADOS	
No. Coneja	No. embriones
1	38
2	35
3	33
4	39
5	36
6	20
7	*
8	17
9	*
10	16
Total	234

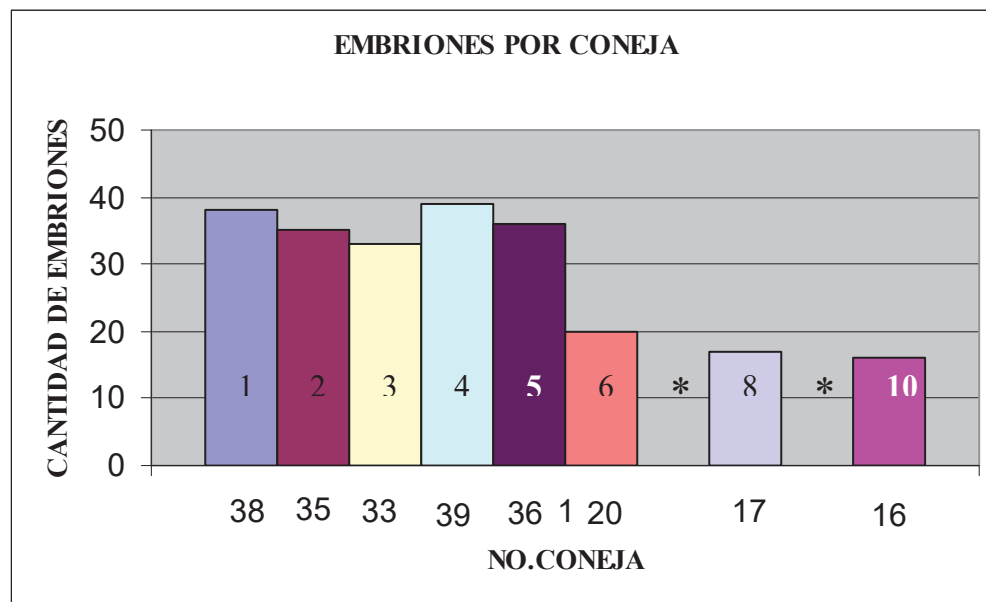
Cuadro No. 1: Resultados de los tratamientos en las conejas

Cada coneja que fue súper ovulada nos brindo más y mejor calidad en los embriones que se extrajeron denotándose la realidad entre los tratamientos utilizados, quedando comprobada nuestra hipótesis inicial que nos planteamos.

Como se pude observar en la tabla de arriba, se muestra que la cantidad de embriones que nos dieron las hembras tratadas con Fertagyl. Así como se muestra en la grafica de abajo.



Grafica de resultados no. 1 se pueden observar en grafica de polígono de frecuencias el cambio tan notable entre los controles negativos a la derecha y los tratados en la parte superior izquierda.



Grafica de resultados no. 2 Así pues, también se observa el la marcada diferencia entre el No. de embriones colectados de cada uno de los demás tratamientos y de su calidad se ejemplifica abajo en las siguientes fotos y su valoración es mediada de acuerdo a la valoración de procedimientos de FIV incluida en la revisión literaria.

EFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román

Se determino que la aplicación de **Fertagyl** sirve también como estimulante para la copula pues las conejas que no aceptaban al macho en el primer intento después de ser inyectadas y transcurrido un lapso de tiempo 2 o 3 hrs. Aceptaron la monta denotándose la coloración rojiza de la vulva señal eminente de celo y aceptación al macho.



A) La coneja se resiste a la monta B) Se aplica el tratamiento hormonal Fertagyl en dosis de 20μ (0.20ml) C) La coneja se muestra más receptiva se coloca en posición de celo D) Si se observa la vulva de la coneja se torna rojiza y es cuando se entiende que esta lista para el apareamiento.



CONCLUSIONES

Se comprobó la hipótesis que se planteó que al inducir la superovulación con la GnRH se maduraron los folículos más pronto y en mayor número y por ende al momento de la ovulación la tasa de fertilidad aumentó considerablemente pues los embriones recopilados con las hembras donde se aplicó el tratamiento fueron de mayor número y fueron de mejor calidad.

Concluyendo que la aplicación del tratamiento es buena cuando se requiera de mayor número de crías o bien para razas de baja prolificidad, como es el caso de las razas de producción de piel como lo es el Castor Rex.

Además de mejorar la fertilidad las técnicas de superovulación, sincronización, recolección y congelamiento de embriones son las herramientas básicas de las biotecnologías reproductivas.

También se determinó que a parte de superovular a las conejas el tratamiento vuelve a las conejas aun más receptivas al momento del celo y aceptan la copula de 3 a 4 hrs. Después de la aplicación de Fertagyl por vía intramuscular.

Se demostró que el DMSO bien puede ser utilizado para el resguardo de la criopreservación de los embriones tan bien como lo es para las células por el contenido de glicerol. Así pues concluimos nuestra investigación y quedando abierta a otras perspectivas de investigación para darles continuidad a dicha investigación como se enumeran en la parte de las Perspectivas.



AGRADECIMIENTOS.

A continuación hacemos una lista de las gentes e instituciones a las que les agradecemos la accesoria prestada y las facilidades que se nos otorgaron para la elaboración del presente trabajo:

✓ **PHD. ARIEL JIMÉNEZ TORRES.**

Coordinador y Accesor del modulo de reproducción de los mamíferos que aunque le sacamos canas verdes a veces de coraje esperamos también dejarle una buena impresión como estudiantes, alumnos y futuros investigadores.

✓ **DR. MARCO CAJERO JUÁREZ.**

Por la accesoria brindada en el CMEB y su confianza para realizar el presente trabajo de investigación que fue importante para nosotros como futuros investigadores y haber sido nosotros los que propusimos la idea y se nos apoyo hasta cumplir el cometido.

✓ **M.C RIGOBERTO ROMERO VARGAS.**

Por las facilidades otorgadas desde el día de la propuesta informal y que nos apoyo en el área más difícil los recursos del material biológico y las asesoráis sobre la especie a tratar pues es el especialista en cunicultura.



✓ **ESTUD. MED. VET: BLANCA AURORA MARTINEZ COTES.**

Por el apoyo que me brindo a pesar de no ser su obligación, y el apoyo en cada una de las actividades, así como para la elaboración del trabajo de investigación y dentro del área moral también y la paciencia tan grande para esperarse hasta terminar el trabajo desde las 7:00 Am. a las 9: 00 Pm.

También queremos a agradecer a los espacios físicos que se nos otorgaron para la elaboración del presente trabajo dentro de los cuales están los siguientes:

- ✓ **CMEB.**
- ✓ **TALLER DE PRODUCTOS CARNICOS..**
- ✓ **SECTOR CUNICOLA.**
- ✓ **SECTOR DE CÓMPUTO.**
- ✓ **BIBLIOTECA DE LA F. M. V. Z.**



ANEXOS.

Dentro del trabajo escrito se hace necesario el esclarecer algunas de las actividades realizadas como de los equipos utilizados y de ahí la importancia de meter el área de anexos para esclarecer cada uno de los planteamientos.

Para conocer el trabajo en general se hará una descripción de las actividades realizadas en la investigación bajo el siguiente nombre.



CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Para la elaboración del trabajo de investigación se llevo acabo un plan a seguir dentro del cual se comprendían varias tareas a realizar como se muestra en el cuadro de abajo.

CUADRO 1. 0 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades.	Fecha.	Observaciones.
1. - Selección y sexaje de las hembras a utilizar.	Lunes 8 de Noviembre del 2004.	Se coloco de 2 en cada jaula y se les suministro alimento comercial purina.
2. - Primer pesaje	Lunes 29 de Noviembre del 2004.	Esto es para saber si alcanzaran el peso ideal ala momento de la monta.
3. - Segundo Pesaje.	Domingo 26 de Diciembre del 2004.	Alcanzaron su peso ideal entre los 3,000 y 3,500. Kg.
4. - Aplicación del tratamiento (Fertagyl, Intervet, México)	Lunes 27 de Diciembre del 2004.	Hubo aceptación total por parte de las hembras tratadas con el hormonal, y no siendo igual las demás no tratadas.
5. -Montas a las hembras.	Lunes 27 de Diciembre del 2004.	Se repitió la monta en la tarde.
6. - Sacrificio de las hembras y recolección de los embriones.	Lunes 27 de Diciembre del 2004.	Se extraerán y se fotografiarán



En la tabla de abajo se muestra el orden de los apareamientos, así como la relación de machos que las montaron en la 1^{era} y 2^{da} monta, así como las hembras que fueron superovuladas con GnRH.

Fecha de Realización: Lunes 27 de Diciembre del 2004.

CUADRO 1.1 CONTROL DE MONTAS			
1 ^{era} MONTA 10:00 AM		2 ^{da} MONTA 5:00 PM	
NO. HEMBRA.	MACHO.	TRATAMIENTO.	MACHO.
1	JR	✓	JR
2	D	✓	T
3	R	✓	R
4	M	✓	M
5	I	✓	Y
6	W	No	W
7	*	No	*
8	LL	No	LL
9	*	No	*
10	GC	No	GC

* Estas conejas no aceptaron al macho pues tenían quistes foliculares (detectados en el estudio postmortem) y no aceptaban la copula con el macho.



PESO DE LAS CONEJAS A UTILIZAR EN SUPEROVULACIÓN.



FECHA DE REVISIÓN

Lunes 29 de Noviembre del 2004.

NO. DE CONEJA	PESO EN KG.
1	2,780
2	2,800
3	2,990
4	3,200
5	2,760
6	2,580
7	3,160
8	2,060
9	2,540
10	3,200

NOTA: LAS CONEJAS FURON DIVIDIDAS PARA EVITAR LAS FALSAS GESTACIONES ENTRE ELLAS.

EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román



FECHA DE REVISIÓN

Domingo 26 de Diciembre del 2004.

NO. DE CONEJA	PESO EN KG.
1	3,180
2	2,940
3	3,160
4	3,180
5	3,020
6	3,080
7	3,520
8	3,960
9	2,960
10	3,240

NOTA: SE PESARÓM UN DÍA ANTES DE LA MONTA.

EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román

**ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA ETIQUETA.****CONEJINA "N"
CONTENIDO NETO 40 KG.****REG. S. A. G. A. R. A - 0207 -022**

COMPONENTE	%
HUMEDAD	12.00 % MAX
PROTEINA	15.00 % MIN
GRASA	2.00 % MIN
FIBRA	15.00 % MAX
CENIZAS	9.00 % MAX
E. L. N.	46.50 % MAX
CALCIO	1.00 % MIN
FOSFORO	0.55 % MIN

Cuadro 1. 2 Arriba se muestra una etiqueta del análisis bromatológico del aliento suministrado a los conejos y abajo la imagen del costal de 40 Kg.



**EFFECTO DE SUPEROVULACIÓN Y RECOPIACIÓN DE EMBRIONES EN CONEJAS UTILIZANDO
COMO FUENTE LA HORMONA GNRH (FERTAGYL)**

P. M. V. Z. Yoshio Iván Macswiney Román



BIBLIOGRAFÍA.

1. Arlotto T., Schwartz J.L., First N.L., Leibfried M.L. 1996. aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45:943-956.
2. Armstrong D.T, Holm P., Irvine B., Petersen B. A, Stubbings R. B., Mc Lean D., Stevens G., Seamark, R.F. 1992, Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 38: 667-678.
3. Ambrose, J.D.,S.K. Singla, S. Jaikhani, B.S. Prakash, M.L. Madam, 1991. Superovulation responses in Buffaloes (*Bubalus*) to different treatment regimens of Folltropin. *Theriogenology*, 35(1):181.
4. Blondin P., Coenen, K., Guibault, L. A, Sirard, M.A. *In vitro*. 1997production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47: 1061-1075.
5. Bols P. E., Van Soom A., Ysebeart M.T., Van Den Heede J.M., Kruip A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45:1001-1014.1996.
6. Carolan C., Monaghan P., Gallagher M., Gordon I. 1994. Effect of recovery method of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1061-1068.
7. Castellanos E. F. A. 1990. Manual para la educación agropecuaria. Editorial Mundi prensa; México D. F..
8. Dixon, T.E., J.W. Hunter, N.S. Beatson. 1991. Pregnancies following the



- export of frozen Red Deer. *Theriogenology*, 35(1):193.
9. E. S. T. Hafez, 1993. Reproducción e inseminación en animales, Editorial Mundi prensa; México DF.,.
 10. Editor G and Ory S. J, 1989. Recent advances in reproductive technology. *Clinical Obst. Gynecol.* Vol. 32, No. 3, P. 519.
 11. Edwards R. G, Steptoe P.C, and Purdy J. M, 1980. Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown In Vitro. *Br. J. Obst. Gynecol.* 87: 373.
 12. Fayrer-Hosken R.A., Caudle A.B. 1991. The laparoscope in follicular oocyte collection and gamete intrafalopian transfer fertilization (GIFT). *Theriogenology* 36: 709-724.
 13. Francese Lleonart, Roca, 1980. Tratado de cunicultura, Editorial Acribia, Barcelona España
 14. Frias, A. M. y Tolosa, J.: *Histología Veterinaria*. 1980.Fascículo..Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México,
 15. Gibbons J.R., Beal W.E., Krisher R.L., Faber E.G., Pearson R.E, Gwwaskauskas F.C. 1994. Effect of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiartion on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42:405-419.
 16. Gordon I, Lu H. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.
 17. Hamano S., Kuwayama M. 1993. Invitro fertilization and development of bovine oocytes recovered fron the ovaries of the individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology* 39:703-712.



18. Kasiraj, R., M. Mutha Rao, N.S. Rangareddi, A.K. Misra. 1992. Superovulatory response in Bullaloes following single subcutaneous or mutiple FSH administration. *Theriogenology*, 37(1):234.
19. Kruip A.M., Pieterse M.C., Van Beneden H., Vos, I.A. wurth Y.A, Taverne M.A. 1991. A new metod for bovine embryo production: a potentia alternative to superovulation. *Veterinary Record* 128:208-210.
20. Kruip A.M., Boni R., Wurth Y.A., Pieterse M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42:675-684.
21. Leibfried M.L., Critser E.S. Parrish J.L, Fist N.L. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31: 6174.
22. Lonergan P., Vergos E., Kinis A., Sharif H., Gordon I. 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. *Theriogenology* 35:231 (Abstract).
23. Misra, A.K., B.V. Joshi, P.L. Agrawala, R. Kasiraji, S. Sivarah, N.S. Rangareddi, M.U. Siddigue. 1990. Multiple ovulation and embryo transfer in Indian Buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology*, 33(5):1131-1141.
24. Misra, A.K., B.V. Joshi, R. Fasira. S. Sivaiah, N.S. Rangareddi. 1991. Improved superovulatory regime for Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 33(1):289.
25. Pieterse M.C, Kappen K.A., Kruip A.M., Taverne M.A. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.
26. Pieterse M.C., Kruip A.M., Wurth Y.A., Van Beneden H., Taverne M.A. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiartion of bovine oocyte.



Theriogenology 35: 19-24.

27. Pieterse M.C., Vos P.L., Kruip A.M., Willemse A.H., Taverne M.A. 1991. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology* 35:401-413.
28. Quigley M. M, 1984. The use of ovulation inducing agents in in vitro fertilization. *Clinical Obst. Gynecol.* Vol. 27, No. 4. P. 983 - 992.
29. R. D Franson, 1992. Anatomía de los animales domésticos, Editorial Cessa, México D. F.
30. Sekine J., Sakurada T, Oura, R. 1992. Optimum temperature of ovarian transportation for *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Vetrerinary record* 131:372.
31. Sirois, J., T.L. Kimmich, J.E. Fortune. 1992. FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares. *Theriogenology*, 37(1):300. Steptoe P. C, and Edwards R. G, (1976): Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1:880.
32. S.Sisson-J.D., Grosman-Robert Getty, 1999. *Anatomía de los animales domésticos*, 5ta edición, Editorial CESSA; México DF.
33. Stubbing R.B, Walton J.L. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 43:705-712.
34. Tervit H.R. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenil breeding. *Animal reproduction Science* 42:227-235.



35. Thompson, J.G.E., G.W. Asher. 1988 superovulation and ova recovery in farm Fallow Deer (Dama dama). ASRB Conference 1988. Newcastle, Australia.
36. Van Der Schans A., Van Der Westerlaken L.A. Eyestone W.H. Boer M.A. 1991. (Abstract). Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. Theriogenology Vitro. 35:288
37. Yee B and Vargyas J. M, 1986 Multiple follicle development utilizing combination of clomiphene citrate and Human Menopausal Gonadotropins. Clinical Obst. Gynecol. Vol. 29, No. I, P. 141 - 147.