

01621  
51



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

## DESCRIPCIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE CUATRO EQUIPOS EMPLEADOS PARA LA CONGELACIÓN DE EMBRIONES Y EVALUACIÓN DE CURVAS DE DESCENSO DE TEMPERATURA.

### TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA  
ADRIANA MARTÍNEZ CASTRO



ASESORES:  
MVZ. SALVADOR ROMO GARCÍA  
MVZ. JORGE AVILA GARCÍA  
MVZ. PEDRO CANO CELADA  
MVZ. PEDRO OCHOA GALVAN

MÉXICO, D.F. MARZO 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# PAGINACION

# DISCONTINUA



I  
DEDICATORIA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A DIOS: Por permitirme llegar hasta aquí y no soltarme nunca de su mano.

A MI ABUELA

CARMELA: (Q.E.P.D.) El ser que más he querido en la vida. Gracias por tu sabiduría y por haber dedicado una gran parte de su vida a sus nietos de los cuales formo parte.

A MI MADRE: Le agradezco su Amor, Apoyo y Confianza. Por estar junto a mí en todo momento.

A MI PADRE: Gracias, por ese carácter duro, por las palabras de aliento que han sido de igual manera duras.

A MIS HERMANOS: Mario, Omur y Francisco. Por su cariño.

A MIS TIOS: Marcial y Félix por su apoyo.

A MIS PADRINOS: Sara y Pablo Alcántara por el apoyo brindado y sus consejos.

A MI AMIGA: Isa gracias por que has sido un gran apoyo y sin tí no lo habría logrado gracias.

A MIS AMIGOS:

Cecilia Segura, Ensuk Chon (Elena), Paty Núñez, María Seo, Diana, Julián: por su amistad y apoyo brindado para la realización de este trabajo, y algunos pese a la distancia gracias a su apoyo incondicional.

AL DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN:

Por su ayuda, comprensión y apoyo

Autorizo a la Dirección General de Biblioteca:  
UNAM a difundir en formato electrónico e im-  
primir el contenido de mi trabajo respectivo

NOMBRE: Martinez Castro

Alina

FECHA: 17-marzo-03

FIRMA: Alina Martinez Castro

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

II

**AGRADECIMIENTOS**

**AL DR. SALVADOR ROMO:** Por brindarme su Confianza, Apoyo, Compresión y su invaluable amistad.

**AL DR. JORGE ÁVILA:** Por su disponibilidad, tiempo apoyo y confianza para la realización de este trabajo.

**AL DR. PEDRO CANO:** Por su confianza y su apoyo.

**AL DR. PEDRO OCHOA:** Por su apoyo, confianza, aportaciones brindadas y disponibilidad de tiempo para la realización de este trabajo.

Y sobre todo por la paciencia que tuvieron para conmigo en la realización de este trabajo.

Gracias por ser mis asesores

III  
INDICE

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

	Página
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE.....	III
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL Y METODOS.....	11
ANÁLISIS ESTADISTICO.....	17
RESULTADOS.....	18
DISCUSION.....	24
CONCLUSION.....	26
LITERATURA CITADA.....	27
FIGURAS.....	33
APÉNDICE I.....	39
APÉNDICE II.....	45
APÉNDICE III.....	50
APÉNDICE IV.....	55

RESUMEN

MARTÍNEZ CASTRO ADRIANA. Descripción de la utilización de cuatro equipos empleados para la congelación de embriones y evaluación de curvas de descenso de temperatura. (Bajo la dirección de MVZ. Salvador Romo García. MVZ. Jorge Avila García. MVZ. Pedro Cano Celada. MVZ Pedro Ochoa Galván).

El objetivo del presente trabajo fue describir cuatro diferentes equipos de congelación dos de ellos son manuales: Elsdén y Bovet, uno más es semiautomático: que Robertson y el último es un equipo Automático: y por medio de la comparación de sus correspondientes curvas de descenso de temperatura con la finalidad de proponer el equipo más adecuado para su uso a nivel de campo y en laboratorio en México. Se realizó un análisis estadístico para determinar que cada equipo cumplió con las especificaciones del fabricante. Los resultados mostraron una diferencia mínima en el tiempo promedio de congelación entre los equipos, las curvas en los cuatro equipos fueron constantes en cuanto a descensos de temperatura, los coeficientes de determinación de cada equipo fueron Elsdén 98%, Bovet 97%, Robertson 98% y la automática 99%. Se concluye que los cuatro equipos reúnen las condiciones óptimas para la congelación, teniendo en cuenta que cada equipo tiene diferencias en cuestión de costos, y funcionamiento.

DESCRIPCION DE LA UTILIZACION DE CUATRO EQUIPOS EMPLEADOS  
PARA LA CONGELACION DE EMBRIONES Y EVALUACION DE CURVAS DE  
DESCENSO DE TEMPERATURA

INTRODUCCION

El mejoramiento genético de los animales domésticos. representa una de las mayores posibilidades para generar beneficio en la producción animal. Por ello, el estudio de técnicas nuevas que faciliten su aplicación práctica en cualquier sistema de explotación, mejorando la eficiencia de la producción ganadera <sup>17.28</sup>

Una limitante para los programas de transferencia de embriones era la falta de un método de almacenamiento práctico del material biológico que lo preservara por tiempo indefinido como ocurre con la congelación de semen. <sup>18</sup> La congelación de embriones tiene como objetivo detener el desarrollo de los embriones sin afectar su viabilidad permitiendo su conservación por largo tiempo. <sup>16.27.30</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la actualidad la congelación de embriones es una parte integral en los programas de transferencia de embriones,<sup>7,26,27</sup> facilitando y abaratando los costos de transportación de material genético a nivel nacional e internacional. por otra parte se reduce el riesgo de transmitir ciertas enfermedades.<sup>10,19,26</sup>

A nivel práctico en el campo, el poder colectar embriones en cualquier época del año permite optimizar el potencial reproductivo de donadoras valiosas difíciles de adaptar al medio ambiente.<sup>21</sup>

El primer reporte sobre la congelación de embriones de mamíferos fue realizado por Whittingham (1971), que informa el nacimiento de ratones producidos de embriones congelados a  $-79^{\circ}\text{C}$ .<sup>36,38</sup>

Los reportes acerca de la congelación de embriones entre 1950 y 1960 indican que el porcentaje de embriones que continuaron su desarrollo después de ser congelados y descongelados, fue bajo<sup>2,7</sup> reportándose fetos viables, pero no pudiendo repetir los resultados con la misma técnica. En el mismo periodo se reportó la congelación de embriones murinos a  $-79^{\circ}\text{C}$ , pero su viabilidad se reducía si se mantenían a esa temperatura por más de 30 minutos.<sup>1,18,36</sup>

El primer éxito probado en la historia de la congelación de embriones de mamíferos a temperaturas menores ocurrió en 1972 cuando fueron congelados embriones de ratón a  $-196$  y  $-296^{\circ}\text{C}$ , a partir de lo cual se congelaron embriones de otras especies.<sup>28,29</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En 1973 ocurre el nacimiento del primer becerro producto de la transferencia de embriones congelados lo que demostró que dicha técnica es una buena estrategia para almacenar material genético. <sup>8,32</sup> y que los embriones de bovinos se conservan viables por más de un año a  $-196^{\circ}\text{C}$ . <sup>20,37,40</sup>

La congelación de embriones se ha empleado desde finales de la década de los 80's y se ha convertido en parte integral de la ganadería. <sup>31</sup>

Por razones prácticas y económicas, se ha demostrado que la forma más segura de almacenar los embriones es en nitrógeno líquido, es a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , por más de 100 años sin presentar daño alguno. <sup>32</sup> Por lo mismo, no existen obstáculos para la conservación de embriones. <sup>33,38</sup> algunos investigadores han pronosticado que la comercialización de embriones congelados tendrá un impacto sobre la ganadería de magnitud similar al que tuvo la inseminación artificial en lo años 50's y 60's. <sup>15</sup>

Por otra parte, la creación de bancos de embriones que faciliten la distribución de los mismos podrían incrementar la producción animal.

La congelación de embriones es una tecnología en aplicación, que bien se puede efectuar en las instalaciones de un centro de colecta y transferencia o en el mismo rancho.

Se ha planteado la necesidad de implementar técnicas de menor costo con los aparatos manuales de congelación, para ser utilizados a nivel de campo. <sup>3</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Existen en el mercado diferentes equipos para congelar embriones los cuales no han sido comparados en cuanto a su eficiencia, como los empleados en el presente estudio. Los equipos que se utilizan con frecuencia son Elsdon, el Bovat, Robertson y el automático Freezer Control CL 2000.

Los embriones congelados presentan mayores ventajas en comparación a los embriones frescos: a continuación se mencionan algunas:

#### VENTAJAS DE LA CONGELACION DE EMBRIONES.

- I. Prescindir de receptoras sincronizadas de un hato para transferirlos inmediatamente después de la colecta de embriones.<sup>3.4</sup>
- II. Congelar embriones para usos futuros.<sup>5.4</sup>
- III. Abaratar los costos al transportar embriones congelados a diferencia de lo que costaría hacerlo con ganado en pie.<sup>4.4</sup>
- IV. Multiplicar la progenie normal de una vaca acumulando una gran cantidad de embriones de la misma madre y diferente padre para ser utilizados en lugar y tiempo distintos.<sup>6</sup>
- V. Obtener un gran número de becerros genéticamente similares y de la misma edad, ya sea para la reproducción o para efectuar comparaciones, como calificar animales

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

reproductivos de calidad superior, a la edad más temprana posible. \*

- VI. Colectar embriones durante todo el año. \*
- VII. Poner a la venta embriones congelados entre ganaderos y compañías especializadas. \*
- VIII. Transportar embriones en forma rápida y barata, minimizando el riesgo de transmisión de enfermedades siempre y cuando se reúnan los requisitos sanitarios. \*
- IX. Importar o exportar a futuros becerros de calidad superior a sitios donde las cuarentenas o las condiciones sanitarias dificultan su introducción en pie, manteniendo hatos libres de enfermedades específicas. \*
- X. Transferir a receptoras locales y adaptadas, lo que confiere cierta inmunidad contra algunas enfermedades comunes de esa región. \*
- XI. Incrementar el hato sin incorporar ganado adulto. \* 6.18.23
- XII. Preservar razas exóticas o en peligro de extinción o de alta valía en bancos de embriones congelados. \*\*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DESVENTAJAS DE LA CONGELACION DE EMBRIONES.

- I. Alto costo del equipo. 1
- II. Sólo se deben congelar embriones de calidad 1 y 2 en un estadio de mórula, blastocisto inicial y blastocisto maduro. "
- III. Cerca de una décima parte de los embriones congelados y descongelados son severamente afectados en el proceso. "23
- IV. Es recomendable que no pasen más de dos años para aplicar los embriones congelados, para garantizar su viabilidad y su permanencia como animales de calidad superior. \*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## HIPÓTESIS

Los equipos de congelación manual darán resultados similares que los equipos automáticos bajo las mismas condiciones de campo. lo que permitirá su uso dentro de la situación socioeconómica y de trabajo en nuestro país.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### OBJETIVO GENERAL

Describir y comparar las curvas y los tiempos de congelación de cuatro aparatos diferentes para la congelación de embriones, así como evaluar los aspectos prácticos para la congelación de embriones de encontrar el aparato más recomendable bajo condiciones de campo en nuestro país.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Mediante la realización de 15 pruebas en cada uno de los aparatos, encontrar el mejor para la congelación de embriones, comparando diferentes aparatos de congelación, cada uno con sus características específicas.
- Determinar cual de los aparatos que se compararán presenta mayores ventajas para ser utilizado a nivel de campo y laboratorio.
- Comparar las curvas de temperatura que expresa cada uno de los aparatos en un tiempo determinado.
- Evaluar el costo de los aparatos y su disponibilidad en el mercado nacional.
- Encontrar el aparato que reúna las condiciones óptimas para la congelación de embriones, con base en aspectos como disponibilidad en el mercado nacional, la facilidad

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de uso en campo y laboratorio. su mantenimiento y evaluación de la curva de congelación. así como su posible uso en condiciones de campo en México.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Fertilización In Vitro del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U. N. A. M. Se utilizaron cuatro equipos de congelación, dos de ellos son manuales el Elsdén y el Bovet, que utiliza etanol. El Robertson es un equipo semiautomático y el Automático Freezer Control CL 2000.

## CONGELADORA TIPO ELSDEN

Consta de un cilindro de acero inoxidable con orificios verticales donde se colocan las pajillas en la parte superior, por el centro sale una varilla de aluminio en forma de T, con orificios transversales que sirven para fijar la congeladora al cuello de termo (MVE\_SC 20/20).

El nivel de nitrógeno deberá estar a menos de la mitad de la capacidad del termo, por lo que se midió al inicio de cada prueba.

Dado que la congeladora, requiere de un preenfriado en vapores de nitrógeno.<sup>3,13</sup> (Figura 1) El ajustar el nivel correcto es de gran importancia al colocar la varilla en la congeladora. En el cilindro se introduce una pajilla que contiene medio de transferencia y el termocouple del termómetro digital.<sup>49</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA TIPO BOVET

Este equipo consta de un plato estabilizador de aluminio que se adapta a la parte externa del cuello del termo (CP-100 Taylor Warton). El plato, por otro lado, tiene ranuras para fijar la congeladora.

El aparato consta de un recipiente cilíndrico de aluminio con una varilla con orificios transversales donde se introduce una nueva varilla que fija a la congeladora. En la parte interna, tiene otros orificios donde se coloca etanol (1 ml) y las pajillas con medio de transferencia y el termocouple del termómetro digital.<sup>40</sup>

El termo debe de estar a menos de la mitad de capacidad para trabajar solo con vapor de nitrógeno. El ritmo de descenso de la temperatura se ajusta introduciendo y/o retirando la congeladora del cuello del termo.<sup>40</sup> (Figura 2 )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA ROBERTSON

Es una congeladora manual y semiautomática que consta de un vaso Dewar de cuello ancho y de aspecto cromado, el cual se llena con nitrógeno líquido y un segundo Dewar, al cual se le agregan de 350 a 500 ml de etanol absoluto y que se sumerge en el nitrógeno líquido contenido en el primer vaso. El segundo vaso tiene una doble pared entre la cual hay un espacio sellado al vacío, lo que permite que el descenso de la temperatura del etanol sea lento, manteniendo el ritmo de congelación deseado. Además se utiliza una bomba para burbujear aire en el alcohol, lo cual homogeniza la temperatura dentro del vaso de cristal.<sup>24</sup>

La temperatura es controlada con un termómetro digital, que es colocado en el segundo vaso. Por medio una pinza, en el interior del vaso de cristal se fija la manguera de la bomba de aire y el polo del termómetro, colocado a la misma altura que se encuentran los embriones en las pajillas. El ritmo de descenso o disminución se pudo ajustar de tres diferentes formas: <sup>6, 21, 24, 29, 30</sup>

- 1.- Incrementando o disminuyendo la cantidad de etanol en el vaso de cristal.
- 2.- Sumergiendo y sacando el vaso de cristal del vaso plateado.
- 3.- Incrementando o disminuyendo la cantidad de aire inyectado por la misma bomba de aire (Figura 3).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se introduce una pajilla cargada con medio de transferencia y el termocouple del termómetro digital.<sup>40</sup>

CONGELADORA AUTOMÁTICA Freezer Control CL 2000 (BIOGENICS, Napa, California U.S.A)

La congeladora es un cilindro pequeño de 55 mm de diámetro y 150 mm de alto: tiene una cubierta de aislamiento, que contiene un sensor de temperatura. En el centro donde se colocan las muestras.

Cuenta con una memoria computarizada que permite utilizar cuatro programas diferentes de congelación que requieren una mínima supervisión y utiliza un baño de nitrógeno líquido con capacidad de alrededor de 1.5 litros.<sup>41</sup> (Figura 4)

La congeladora CL 2000 es preprogramable y tiene un control parcial de congelación de muestras biológicas.

Las pajillas llenadas con medio de transferencia y el termocouple del termómetro digital.<sup>40</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LLENADO DE PAJILLAS

Se utilizaron pajillas de 0.25 ml y se trataron como si se estuviera congelando embriones preparándolas de la siguiente manera:

- 1.- Medio de transferencia
- 2.- Aire
- 3.- Medio de congelación con etilenglicol al 1.5 M con el embrión
- 4.- Aire
- 5.- Medio de transferencia
- 6.- Polvo de poli vinil de carbonato (PVC) . (Figura 5)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELACION

Las pajillas llenadas con medio de cultivo y crioprotector se colocaron durante dos minutos directamente en la congeladora para simular que los embriones dentro de las pajillas se equilibran a la misma temperatura ( $-6^{\circ}\text{C}$  a  $-7^{\circ}\text{C}$ ). Después de 2 minutos, se indujo la cristalización del medio en forma manual, colocando unas pinzas metálicas previamente enfriadas con nitrógeno líquido sobre la marca de la pajilla en un punto alejado donde se supone estaría el embrión a nivel del menisco.

Se estabiliza a esta temperatura durante 10 minutos para posteriormente descender la temperatura a un ritmo de  $-0.3^{\circ}\text{C}$

a  $-0.5^{\circ}\text{C}$  por minuto hasta llegar a los  $-35^{\circ}\text{C}$ . momento en el que las pajillas se sacaron de la congeladora. <sup>9,12,21,24,29,34,35</sup>

Se realizaron 15 repeticiones con cada una de las congeladoras. las gráficas se realizaron de la siguiente manera: se tomó en cuenta el tiempo del cristalización y el de estabilización de la temperatura de 10 minutos a  $-6^{\circ}\text{C}$  ó  $-7^{\circ}\text{C}$ . dependiendo del equipo. posteriormente. se tomo la lectura de la temperatura cada 5 minutos hasta llegar a  $-35^{\circ}\text{C}$  y se procedió a realizar las gráficas cada 15 minutos. <sup>10</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANALISIS ESTADISTICO

Primera Parte. Se determinó si cada equipo cumple con las especificaciones recomendadas por el fabricante tomando como variable el tiempo de congelación, mediante gráficas de control de calidad. ”

Segunda Parte. Realizó un análisis de varianza para un diseño al azar. En caso de encontrarse diferencias entre equipos, se utilizó una prueba de Tukey para detectar diferencias significativas entre los diferentes equipos, en cuanto al tiempo de congelación ”

Tercera Parte. Se realizó una análisis de regresión que es una representación gráfica de la dirección de los datos, donde una serie de líneas de tendencia se utilizan para problemas de predicción teniendo como variable la temperatura.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

Se realizaron 15 pruebas con cada uno de los equipos a comparar y se obtuvieron los valores de media, desviación estándar (DE) y una prueba de t para determinar un intervalo de temperatura quedando de la siguientes manera:

## Congeladora Elsdén:

Al igual que sucedió en cada uno de los equipos a prueba, la velocidad a la que descendió la temperatura fue constante encontrándose en el siguiente rango  $-0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La congelación completa tuvo una duración de  $63.4 \pm 1.55$  minutos (promedio  $\pm$  DE) y un intervalo de 60.6 a 65.1 minutos.

Solo una de las quince pruebas mostró un comportamiento distinto al tener un tiempo de congelación por debajo del límite inferior postulado por el rango dado de la prueba de t, dicho ensayo fue el número 6. los datos completos de cada uno de los ensayos se muestra en el cuadro 1 del apéndice I-1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Congeladora Bovet:**

La congelación completa tuvo una duración de  $62.3 \pm 4.29$  minutos (promedio  $\pm$  DE) y un intervalo de 59.5 a 65.1 minutos.

Los resultados de cada uno de los ensayos se muestra en el cuadro 2 del apéndice I-2.

**Congeladora Robertson:**

La congelación completa tuvo una duración de  $68.2 \pm 4.63$  minutos (promedio  $\pm$  DE) y un intervalo de 65 a 71 minutos.

Al evaluar los datos obtenidos de los quince ensayos se puede observar que cuatro de ellos se encuentra por encima de los valores marcados por el límite superior observado con la prueba de t. de los cuales los ensayos numero 9, 12 y 13 fueron realizados con etanol reciclado por más de tres ocasiones y el cuarto ensayo que muestra un comportamiento diferente al del grupo fue el numero 4 fue debido a un aumento en la cantidad de etanol empleado para la congelación. El detalle de los quince ensayos se muestra en el cuadro 3 del apéndice I.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Congeladora Automática

La congelación completa tuvo una duración de  $67.8 \pm 1.51$  minutos (promedio  $\pm$  DE) y un intervalo de 65 a 70.6 minutos.

Las quince pruebas realizadas con este equipo mostraron un comportamiento similar sin mostrar valores fuera del rango establecido. los datos pueden ser consultados en su totalidad en el cuadro 4 del apéndice I.

En el apéndice II se muestran cuatro gráficas en el mismo orden de aparición del apéndice I. Dichas graficas permiten observar los resultados más representativos de cada una de las congeladoras y la forma en que se comporta el descenso de temperatura en cada una de ellas.

En el apéndice III se pueden observar de forma gráfica los rangos obtenidos para cada una de la congeladoras, mostrando los limites y los valores que caen dentro y fuera de los mismos de los cuatro equipos analizados.

Se realizo una prueba de t con la finalidad de observar diferencia o similitudes entre el comportamiento de los cuatro equipos a evaluar. observándose los siguientes resultados con una significancia del 5%.

Se determinó un variación con respecto a la media de  $\pm 3.23$  minutos (DVS).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los resultados fueron los siguientes

La diferencia entre el primer grupo (Elsden-Bovet) fue de 1.1 minutos, en tanto en el segundo grupo (Robertson-Automática) fue solo de 0.4 minutos.

Se analizó la línea de tendencia polinómica de orden 2, con la finalidad de observar la fluctuación de los valores representados por el tiempo de congelación junto con ello se muestra la ecuación de la recta que permite predecir el cambio de temperatura en un rango de tiempo determinado. La  $r^2$  permite observar hasta que momento los valores incorporados a la recta son datos reales.

La línea de tendencia obtenida en la congeladora Elsdén se ajusta a un 98% de eficiencia, así como la congeladora Bovet ajusta a un 97%, en la Robertson es de 98% y el equipo automático 99% apéndice 1 cuadro 5

Lo cual indica que cuando más próximo a el 1 sea el valor de  $r^2$  más apropiada será la línea de tendencia de cada una de las congeladoras facilitando la realización de estudios comparativos desde el punto de vista estadístico, por mostrarse como verdaderas curvas cuanto más próximo sea el valor a 1. Todo lo anterior se puede observar a detalle en el apéndice IV.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Ventajas y desventajas de los equipos de congelación.

	Congeladora Eisden	Congeladora Bovet	Congeladora Robertson	Congeladora Freezer Control CL2000 Automática
Facilidad de uso	Requiere manipulación constante	Requiere manipulación constante	Requiere manipulación constante	Programable
Cantidad de etanol	No	3 ml por orificio	350 ml	No
Tipo de termo	Boca angosta	Boca angosta	No	No
Nivel de N2	11 cm	10 cm	No	No
Cantidad de N2 usado	No	No	3 Kg	1.5 Kg
Medición de N2	11 cm en promedio	10 cm en promedio		
Transporte	Fácil de transportar	Fácil de transportar	Delicado	Delicado
Mantenimiento	Mínimo	Mínimo	Mínimo	Mínimo
Costo por operación	\$ 30 pesos	\$ 20 pesos	\$ 70 pesos	\$ 20 pesos
Costo por equipo	\$ 1200 dls americanos	\$ 1000 dls americanos	\$ 1500 dls americanos	\$ 4000 dls americanos
Disponibilidad	Importarse de EE.UU	Importarse de EE.UU	Importarse de EE.UU	Importarse de EE.UU

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Ventajas y desventajas de los equipos de congelación.

	Congeladora Eisden	Congeladora Bovat	Congeladora Robertson	Congeladora Freezer control CL2000 Automatica
Ventajas	La curva de congelación es constante	La curva de congelación es constante	La curva de congelación es constante	La curva de congelación es constante
Desventajas			La curva de congelaciones modifica debido a que el nivel de etanol no fue constante	
		Etanol se contamina con cristales de hielo que forma el nitrógeno por lo que pierde potencial de congelación	Etanol se contamina con cristales de hielo que forma el nitrógeno por lo que pierde potencial de congelación	
			Se tienen que evitar las corrientes de aire	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSION

Como se mencionó anteriormente los cuatro equipos de congelación tuvieron la misma eficiencia. Los promedios de congelación completa fueron diferentes en cada aparato: Elsdén (63.4), Bovet (62.3), Robertson (68.2), Automática (67.8). lo cual nos indica que las congeladoras Elsdén y Bovet presentan similitud entre sus características físicas y funcionales.

La curva de congelación que mostraron los equipos evaluados en el presente trabajo fue constante con respecto a los tiempos, con un descenso promedio de  $-0.3$  °C a  $-0.5$  °C por minuto.

La línea de tendencia de la congeladora Elsdén ajusta a un 98% de eficiencia, la congeladora Bovet un 97%. ambos equipos requieren de capacitación previa y manipulación constante para reducir la variabilidad de resultados por consecuencia de manejo.

Es necesario utilizar un termo de boca angosta (para la congeladora Elsdén), el cual debe mantenerse por debajo de la mitad de su capacidad para evitar que la temperatura se acelere y con ello evitar problemas en la curva de descenso de temperatura.

La congeladora Bovet requiere de un termo de boca angosta modelo CP-100, debido a que trabaja con etanol y vapor de nitrógeno para enfriar las paredes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La congeladora Robertson disminuye su velocidad de congelación en forma proporcional al aumento de la concentración de etanol. No hay que olvidar el empleo de la bomba de aire con la finalidad de mantener homogénea la temperatura del etanol.

El etanol no debe emplearse por más de tres ocasiones con el propósito de mantener constante la potencia y reducir el grado de contaminación que sufre a causa del nitrógeno líquido. Además de evitar corrientes de aire ya que provocan variaciones en el tiempo de congelación y aumenta el gasto de nitrógeno.

La congeladora automática presenta menos inconvenientes de manejo debido a que no es necesaria una manipulación tan constante como los equipos antes mencionados.

El ajuste de las curvas para la congeladora Robertson es del 98% y de la congeladora automática fue del 99% de eficiencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES

Con base a los objetivos planteados del presente trabajo se concluye que los cuatro equipos que se evaluaron pueden ser utilizados bajo condiciones de campo en nuestro país.

Mediante las 15 pruebas realizadas en cada equipo se demostró que el Elsdén, Bovet y el Automático Freezer control CL 2000, las curvas de descenso de temperatura fueron constantes a comparación el equipo Robertson debido a que la cantidad de etanol utilizado, tuvo variación en cantidad y el uso del mismo.

Con respecto a las condiciones necesarias para su uso se puede concluir que manejadas por personal capacitado y siguiendo las instrucciones de manejo apropiadas, los cuatro equipos son prácticos y eficientes para congelar embriones bovinos bajo condiciones de campo y laboratorio en México.

La disponibilidad los equipos es similar, puesto que ninguno se vende en el país y ambos tienen que comprarse e importarse de los EE.UU.

Los cuatro equipos presentan una eficiencia muy similar en cuanto a las curvas de descenso de temperatura así como en su uso. lo cual permite utilizar cualquiera de ellas sin mayor problema a los antes mencionados y a su disponibilidad en el mercado mexicano.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LITERATURA CITADA

1. Asprón . P. A. : Técnica de congelación, descongelación y evaluación embrionaria.. Memorias. I Congreso de Transferencia de Embriones en Ganado Bovino. Fac. Med. Vet. Y Zoot. División de Estudios de Posgrado. U. N. A. M. México. D.F. : 115- 125. 1985.
2. Averill. R. L. W and Rowson. L. E. A. : Attempts at storage of sheep ova at low temperatures. J. Agric. Sci. 52: 392-395. 1959.
3. Avila G. J. Los Embriones congelados ofrecen muchas ventajas. Memorias del II taller de transferencia de embriones en bovinos. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Secretaría de Investigación Científica del Centro Estatal de Genética Animal (CEGA). Tlaxcala México 1994.
4. Avila García Jorge: Resultados de la Técnica de Congelación y Descongelación de Embriones en un sólo paso. VIII Curso Internacional de Reproducción Bovina México. 151-154. 1999.
5. Bilton. R .J. and Moore. N. W. : Factors Affectings the Viability of Frozen Stored Cattle Embryos. Asust. J. Biol. Sci. . 32: 101-107. 1979.
6. Cano C. P. Comparación de los porcentajes de fertilidad de embriones bovinos en estadio de mórula y blastocisto con la técnica de transferencia de embriones congelados a nivel de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

campo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U. N. A M. 24-25 1995.

7. Chang, M.C. : Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. Nature (London) . 159 : 602-603. 1947.

8. Chavarria, C.F: La crioprotección en el congelamiento de embriones de vacuno. avance veterinario. 5:42-45. 1987.

9. Coulthard H. Embryo transfer. vet. Rec:130.116. 1992.

10. Dinnyés A, Carolan C, Loneragan P, Solti L, Masip A, Mermillod P. In vitro survival of in vitro produced bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. Theriogenology. 43:197. 1995

11. Elsdén, R.P.: Bovine embryo transfer. Short course Proceedings Presented by the Animal Reproduction Laboratory. Colorado State University, Fort Collins, Co. 1986.

12. Elsdén, R.P and Farrand G. D. Transferring Bovine Embryos. Bovine Embryo Transfer. Short Course Proceedings. Animal Reproduction Laboratory. Colorado State University. Fort Collins, Co. 1986.

13. Elsdén, R. P and Associates. Protocol for Freezing Mammalian Embryos in the RPE Freezer. Campero. Senatobia, MS. 1993.

14. Freeze Control. Manual CL 2000. Manufactured by cryologic. Biogenetics. Napa California. U.S.A.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

15. Gámez F: A: Contribución al estudio de la criopreservación del ganado bovino. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Zootecnista. ITESM 3.4.5.38.39. 1982.
16. Gordon. I.: Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International. University Press \_Cambridge. 303-304. 1994.
17. Lasley. J. F. :Genética del mejoramiento del ganado. UTHEA. México. 1979.
18. Maurer. R. Storage of mammalian oocytes and embryos: a review. Can. J. Anim. Sc. 56: 141-145. 1976.
19. Maurer. R. R. H. Bank and R. E Staples. Pre- and postnatal development of mouse embryos after storage for different periods at cryogenic temperatures. Biol. Reprod. 16: 39-146 1977.
20. Maurer. R. R. Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. Theriogenology 9: 45-68. 1978.
21. Munar CJ. Nigro M.A. Vautier RA. Valdez AR. Manterola R y Viana G. En Cuaderno No 1 Ciencia Agropecuaria. Transferencia embrionaria en el campo argentino. Buenos Aires. Argentina: De Ciencia pura. 1992.
22. Ortíz Francisco J:CH: Primer curso de Transferencia de embriones Memorias. Morelia Michoacán. México 1996
23. Porras. E. Becerros congelados en pajillas. Agricultura de las Américas. Octubre 36-44. 1982.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

24. Robertson. E. Freezing Embryos in a home-made Freezer. Harrogate Genetics International INC. Harrogate. Tennessee. 1993.
25. Schneider U. Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. Theriogenology: 21:68-79. 1984.
26. Seidel G.E. Methods and comparative aspects of embryo cryopreservation in domestic animals. Equine. Vet. J. supp. 8:77-19 1989.
27. Seidel. G. E. Jr : Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Short Course Techniques for Freezing Mammalian Embryos. Colorado State University. Fort. Collins. Colorado. : 7-13. 1983.
28. Seidel. G. E. Jr. 1988 . Principles of cryopreservation of cells. Proceedings. Techniques for Freezing Mammalian Embryos. Animal Reproduction Lab. Colorado State University. 6-13. 1988.
29. Solano R. De Armas R. Caral J. Holy L. Congelación de embriones bovinos. I: Efecto de la calidad y estudio de desarrollo durante la congelación y descongelación. Rvta. cub. Cienc. Vet. 19:183-192. 1988.
30. Suzuki T. Yamamoto M. Ooe M. Nishikata Y. Okamoto K. Tsukihara T. Effect of media on fertilization and development rates of in vitro fertilized embryos, and age and freezing of embryos on pregnancy rates. Theriogenology: 35:278. 1991.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

31. Techniques for Freezing Mammalian Embryos. Short Course Proceedings. Colorado State University. 1988.
32. Touati K. Contribución al estudio de la producción y criopreservación de embriones y hemiembriones en la especie bovina. Tesis de doctorado. Universidad de Liege, Bélgica. 1993.
33. Wayne W. Daniel Base para el análisis de las ciencias de la salud. Bioestadística 3a edición Limusa 1987 Georgia States University.
34. Wenkoff M. Manual de transferencia embrionaria. Canadá. 1992.
35. Whittingham D. G. : Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature (London) . 233 : 125-126. 1971.
36. Whittingham. D.G. Leibo. S.P and Mazur. P.: Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C Science. 178 : 411-414. 1972.
37. Whittingham. D. G. M. F. Lyon and P.H Glenister. Long-term storage of mouse embryos at minus 196°C: The effect of background radiation. Genet. Res. 29:171-181. 1977.
38. Wilmut. I and Rowson. L. E. A. . : Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 92 : 686-690. 1973.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

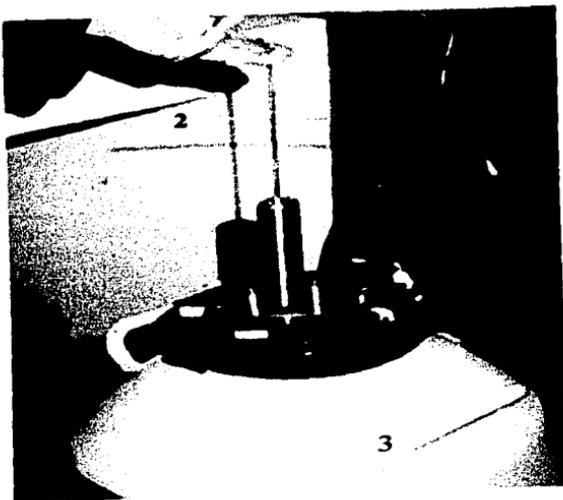
39. Willadsen, S. M. Polen C. Rowson. L: E: A: and Moor. R. M.:  
Deep Freezing of sheep embryos. J. -Reprod. Fert. 46: 151-154  
1976.

Wright M. Joseph. Efficiency of the Bo Vet Creations Embryo  
Freezer. Genetics Managements Service. Castroville, Texas.  
1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURAS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------



- 1.- Congeladora.
- 2.- Varilla.
- 3.- Termo SC-20/20.

Figura 1. Congeladora Elsdon

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- 1.- Congeladora
- 2.- Plato de Aluminio
- 3.- Varilla
- 4.- Termo CP-100 Taylor Warton
- 5.- Termómetro

Figura 2. Congeladora Bovet.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- 1.- Vaso Dewar de cuello cromado
- 2.- Vaso Dewar cristalino
- 3.- Base opcional
- 4.- Pinza fijadora
- 5.- Base con poste para la pinza
- 6.- Bomba de aire
- 7.- Termómetro

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 3. Congeladora Robertson.**



Figura 4. Congeladora Automática Freezer Control CL 2000.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

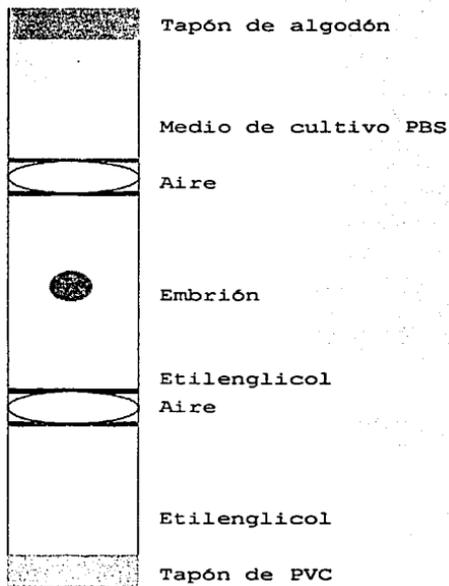


Figura 5. Llenado de Pajilla

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APÉNDICE I

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

Apéndice 1. cuadro 1 Congeladora Elsdén

Número de Congelaciones	Cantidad de nitrógeno	orificio donde se realizó el seeding	orificio donde se realizó la congelación	Tiempo de congelación en minutos
1	14 cm	6	7, 8, 9	66
2	12 cm	12	13, 14	64
3	15 cm	7	8, 9	65
4	12 cm	7	8, 9, 10	63
5	11 cm	7	8, 9, 10	63
6	11 cm	7	10	60
7	13 cm	8	9, 10, 11	62.5
8	12 cm	8	8, 9, 10	64
9	11 cm	7	10	62
10	12 cm	1	9	63
11	12 cm	1	9	64
12	12 cm	6	10	60
13	11 cm	6	10	64
14	11 cm	6	9	63
15	10 cm	1	8	63
				x=63.4

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Congeladora Bovet

Número de congelaciones	Cantidad de etanol utilizada	Cantidad de nitrógeno	Orificio donde se realizó el seeding	Orificio donde se realizó la congelación	Tiempo de congelación en minutos
1	3 cm	30 cm	7	11	66
2	3 cm	¼ cm	9	14	64
3	3 cm	30 cm	9	11, 12, 13	62
4	3 cm	25 cm	10	11, 12, 13	62
5	3 cm	28.5 cm	8, 9	10, 11, 12	50
6	3 cm	12.6 cm	9	11, 12	65
7	3 cm	23 cm	8	11, 12	59
8	3 cm	23 cm	8	11, 12	65
9	3 cm	7.5 cm	9	11, 12	57
10	3 cm	28.5 cm	7, 9	10, 11	65
11	3 cm	0 cm	8, 9	11, 12	66
12	3 cm	17 cm	9	11, 12	62
13	3 cm	30 cm	7	11	65
14	3 cm	11 cm	10	11, 12, 13	62
15	3 cm	14.5 cm	7, 9	11, 12	65
					$\bar{x}=62.3$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Congeladora Robertson

Número de Congelaciones	Cantidad de etanol utilizada	Cantidad de nitrógeno	Tiempo de Congelación en minutos
1	350 ml	3 Kg	64
2	350 ml	3 Kg	70
3	350 ml	3 Kg	63
4	350 ml	3 Kg	75
5	350 ml	3 Kg	61
6	350 ml	3 Kg	70
7	350 ml	3 Kg	63
8	350 ml	3 Kg	66
9	350 ml	3 Kg	75
10	350 ml	3 Kg	70
11	350 ml	3 Kg	65
12	350 ml	3 Kg	73
13	350 ml	3 Kg	73
14	350 ml	3 Kg	70
15	350 ml		65
			$\bar{x} = 68.2$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Congeladora Automática

Número de congelaciones	Cantidad de Nitrógeno	Tiempo de congelación en minutos
1	1.5 Kg	69
2	1.5 Kg	65
3	1.5 Kg	67
4	1.5 Kg	68
5	1.5 Kg	70
6	1.5 Kg	67
7	1.5 Kg	68
8	1.5 Kg	69
9	1.5 Kg	70
10	1.5 Kg	68
11	1.5 Kg	69
12	1.5 Kg	67
13	1.5 Kg	66
14	1.5 Kg	66
15	1.5 Kg	69
		x= 67.8

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 5. Porcentajes de eficiencia

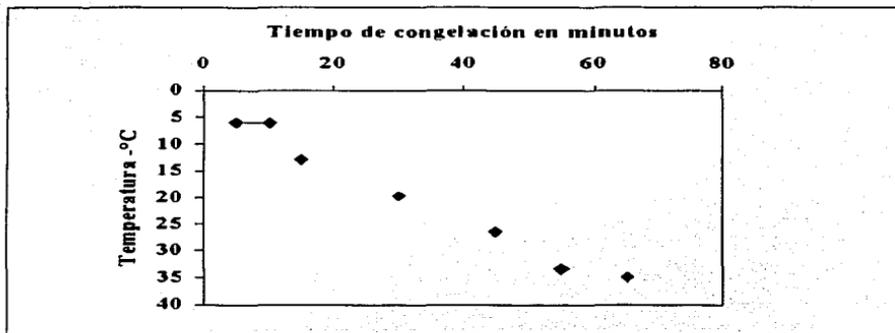
	Elsden	Bovet	Robertson	Automático freezer control CL 2000
Promedio del tiempo de congelación	63.4	62.3	68.2	67.8
Limite superior	65.1	65.1	71	70.6
Limite inferior	60.6	59.5	65.4	65
Desviación estándar	1.55	4.29	4.63	1.51
Porcentaje de eficiencia	98%	97%	98%	99%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE II

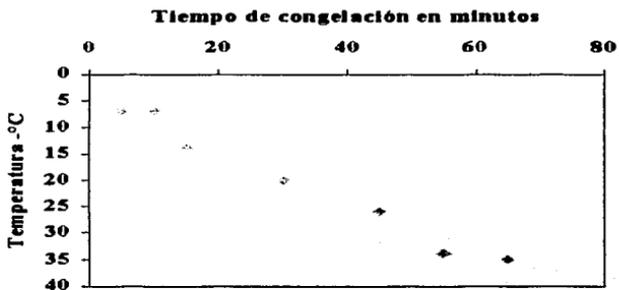
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA ELSDEN



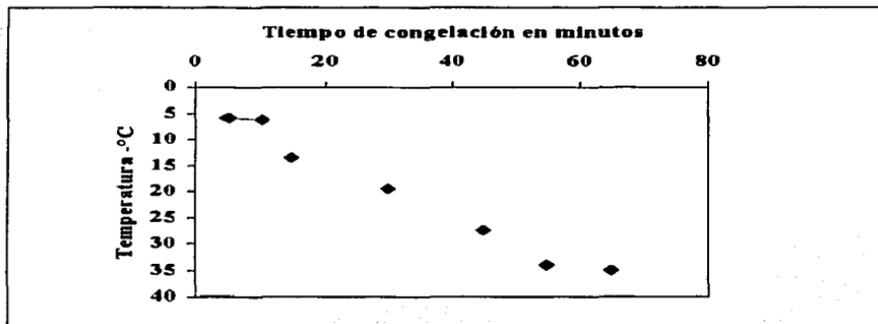
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA BOVET



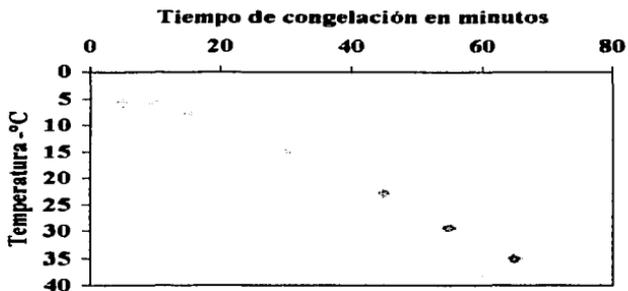
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA ROBERTSON



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA AUTOMÁTICA FREEZER CONTROL CL 2000

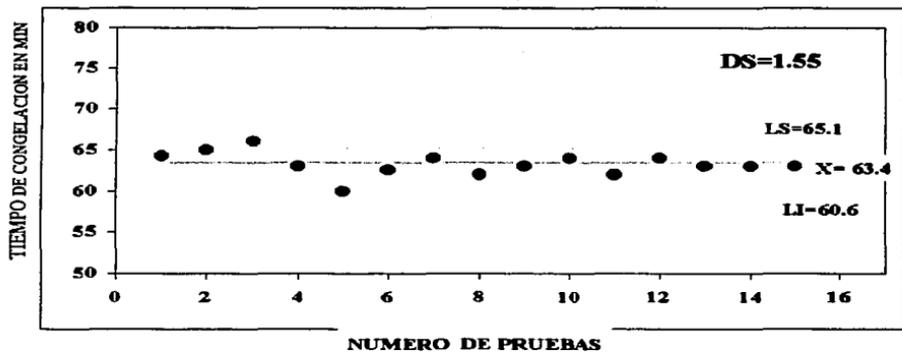


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE III

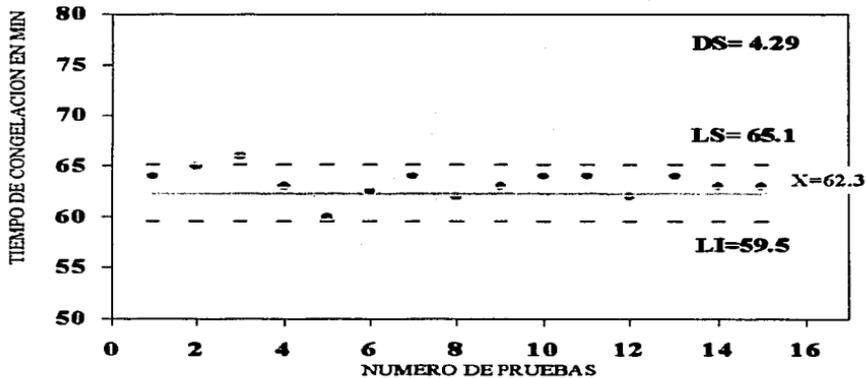
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA ELSDEN



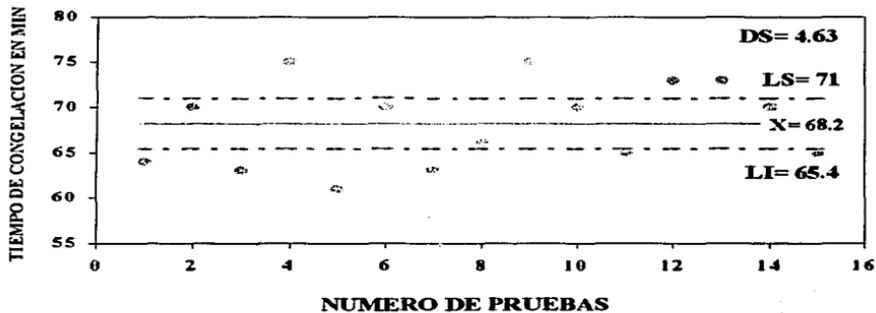
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA BOVET



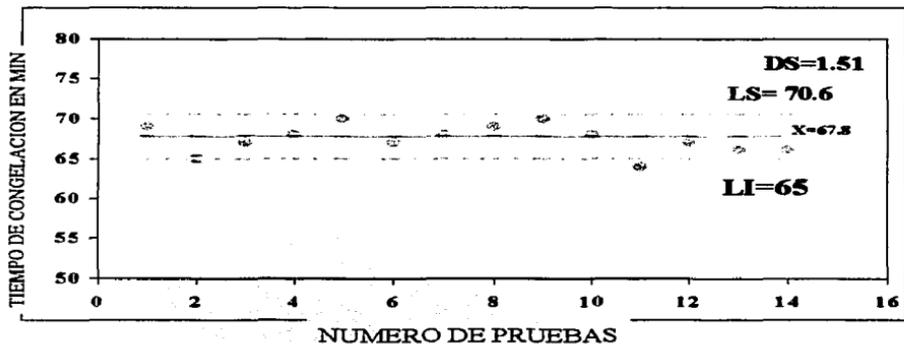
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA ROBERTSON



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA AUTOMÁTICA FREEZER CONTROL CL 2000

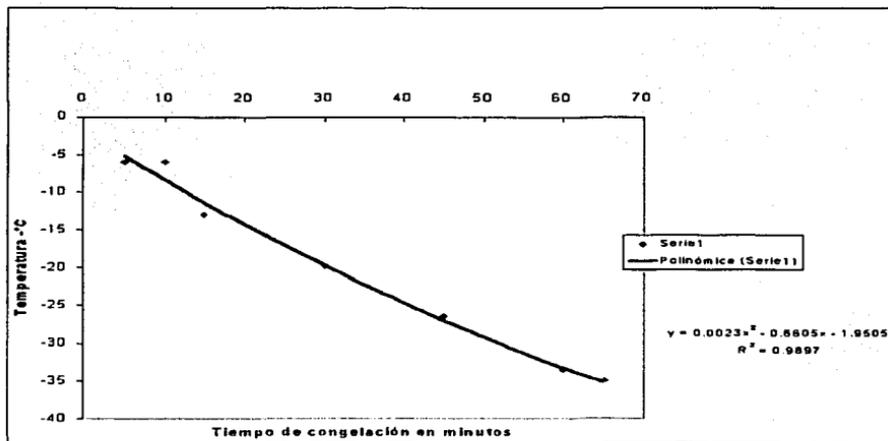


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE IV

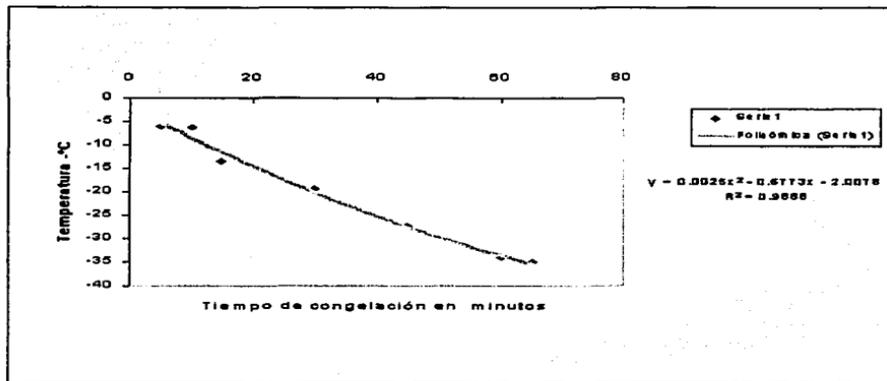
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA ELSDEN



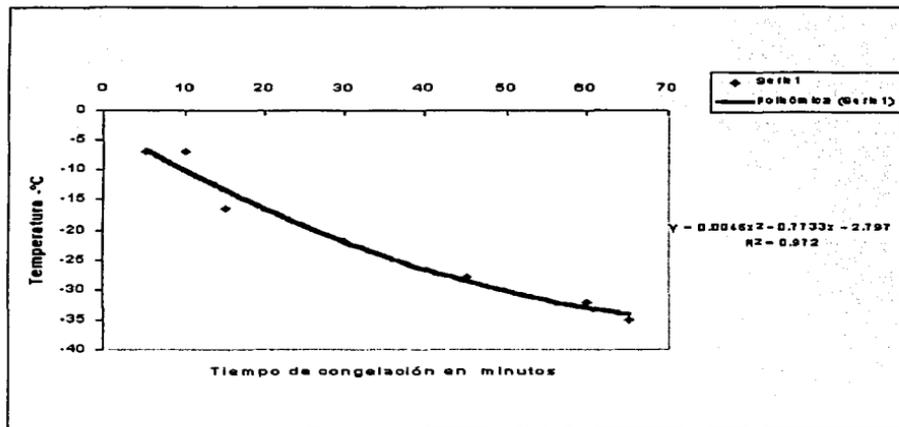
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA BOVET



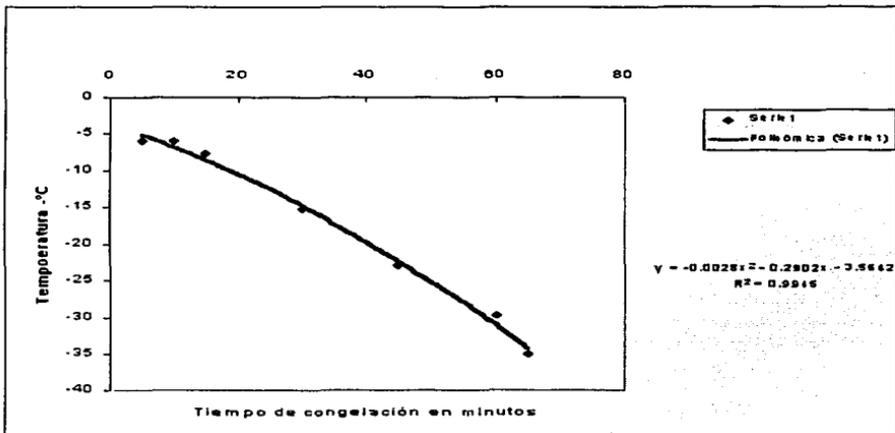
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA ROBERTSON



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONGELADORA AUTOMÁTICA FREEZER CONTROL CL 2000



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA