



Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Universidad Nacional Autónoma de México

"RECUPERACION Y CLASIFICACION DE OVULOS Y
EMBRIONES DE OVINOS Y CAPRINOS EN ORGANOS
GENITALES, OBTENIDOS EN EL RASTRO MUNICIPAL
DE TLALNEPANTLA ESTADO DE MEXICO"

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

presenta

SANCHEZ ZARATE JOSE DAVID

Bajo la Dirección de
M.V.Z. ARTURO TREJO GONZALEZ



V N A M

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1986



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 está 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.

INDICE:

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	11
OBJETIVOS ACADEMICOS.....	12
MATERIAL Y METODOS	13
ANALISIS DE RESULTADOS	15
DISCUSION.....	19
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	20
BIBLIOGRAFIA CITADA	21

INTRODUCCION:

La Técnica de Transferencia de Embriones (TE) puede ser una herramienta de gran utilidad en el mejoramiento genético de los animales de granja. Aunque en los bovinos se han implementado programas limitados a nivel comercial, en los ovinos y caprinos se han utilizado como auxiliar en los proyectos sobre Biología de la Reproducción y Genética (Jillela, 1982; Turner, - 1981).

Entre los principales usos de esta Técnica encontramos: a) la importación de razas mejoradas reduciendo costos y -- permitiendo la adaptación de los corderos al medio ambiente; --- b) se reduce el intervalo entre generaciones hiperovulando a las hembras prepúberes; c) incremento de los partos múltiples incluyendo los gemelos homocigotos por transferencia de blastómeros; - d) aprovechamiento de machos y hembras genéticamente superiores para la mayor producción de sementales con fines de Inseminación Artificial y e) una posibilidad abierta al futuro, sería la producción de copias idénticas de un animal por clonación (Pineda y Bowen, 1980).

Los pasos que abarca la Técnica son los siguientes:

- Hiperovulación y Sincronización.
- Inseminación Artificial.
- Recolección de Embriones.

- Evaluación de los Embriones.
- Conservación de los Embriones.
- Transferencia Embrionaria.

En los ovinos y caprinos el principal freno en el desarrollo de la TE ha sido la imposibilidad de obtener métodos de recolección embrionaria y de transferencia que no requieran cirugía (Willadsen, 1979). Pero aún así la recuperación es baja si se considera el total de ovulaciones referido a la cantidad de cuerpos luteos presentes. Trejo, (1983) reportó que recuperó el 35% de los embriones de ovejas mientras que Martínez y Asprón (1984) recuperaron en la misma especie el 75%. En caprinos los reportes van del 13% (Avendaño, et, al, 1984) hasta el 76% (Eppleston, 1981).

Los factores que determinan estas diferencias son difíciles de determinar, ya que los trabajos fueron realizados en ambientes diferentes, pero es probable que la mayor influencia se deba al tiempo de recolección con respecto al estro, la porción del aparato genital que fué lavada y al volumen del medio colector.

Un aspecto que ha cobrado relevancia para el éxito de las transferencias embrionarias, es la clasificación de los embriones en base a su grado de desarrollo de acuerdo al tiempo-

de recolección y en base a su morfología. Esta evaluación -- determina; que embriones pueden transferirse y cuales no, de acuerdo a sus probabilidades de implantación.

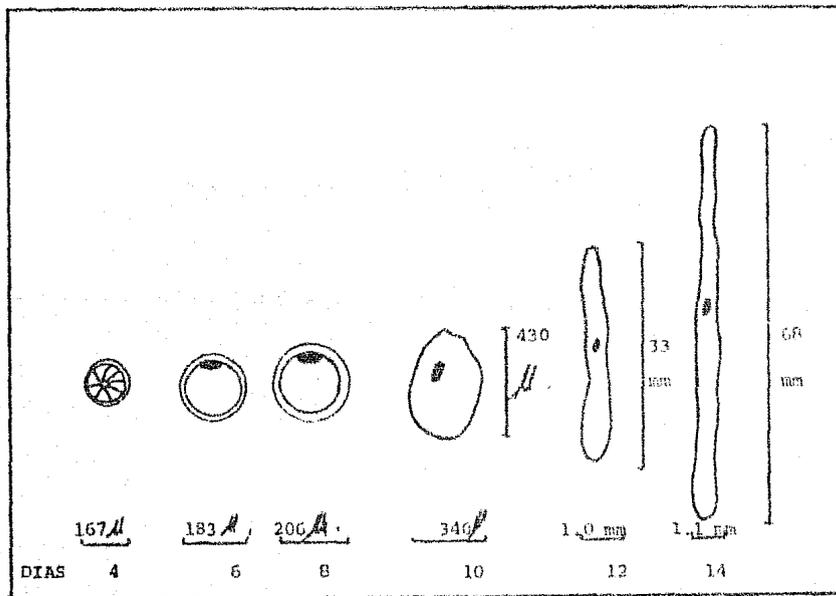
DESARROLLO EMBRIONARIO DE ACUERDO AL TIEMPO DE RECOLECCION.

Es un hecho conocido que el grado de desarrollo -- que ocurre en los cigotos, es igual para las cabras y las -- ovejas (Sugie, et. al., 1980). Tomando como base el día de -- la ovulación tenemos cigotos de una célula durante las prime -- ras 24 horas, en esta fase es a veces difícil determinar si -- existió fecundación y la singamia se ha realizado, o si por -- otro lado, se trata de un ovocito no fecundado. Las formas -- de los blastómeros se observan después de los 24-48 horas, -- es más probable observar cigotos con cuatro blastómeros y -- hasta 72 horas las formas más comunes son la presencia de 8- -- blastómeros y la mórula temprana (Killen I. A., 1978).

Después del cuarto día es posible apreciar mórulas compactas en las cuales la masa embrionaria ocupa del 60 al -- 70% del espacio perivitellino, y en los días 5 y 6 ya está -- integrado el blastocisto temprano el cual comienza a formar una cavidad llena de líquido. En los días 6-8, pasa por las etapas de blastocisto y blastocisto expandido, el cual se -- caracteriza por un adelgazamiento de la zona pelúcida del -- trofoblasto y de la desaparición del espacio perivitellino -- con incremento en el diámetro total. En los días 7-9 el blas

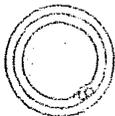
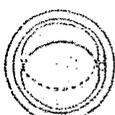
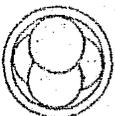
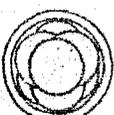
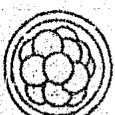
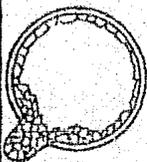
tocisto puede perder la zona pelúcida e iniciar su elongación, esta fase se conoce como blastocisto libre ó blastocisto incubado y crecerá hasta aproximadamente 68 mm. alrededor de -- los días 15-20 en que ocurre la implantación (Figuras 1 y 2)- (Braden y Baker, 1973; Betteridge, 1977; Mc. Laren, 1980).

FIGURA 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CRECIMIENTO EMBRIONARIO OVINO
 ANTES DE LA IMPLANTACION.



TOMADO DE: Braden A.W.H. y Baker A.A., (1973) ()
 The pastoral Industries of Australia.
 Sidney University Press.

FIGURA 2. DESARROLLO NORMAL DE LOS EMBRIONES OVINOS Y CAPRINOS RECUPERADOS EN DIFERENTES ETAPAS DESPUES DEL APAREAMIENTO.

Días después del estro	MORFOLOGIA	Días después del estro	MORFOLOGIA
0 - 1	 1 CELULA	4 - 5	 MORULA COMPACTA
0 - 1	 2 CELULAS	5 - 6	 BLASTOCISTO TEMPRANO.
1 - 2	 4 CELULAS	6 - 7	 BLASTOCISTO
2 - 3	 8 CELULAS	7 - 8	 BLASTOCISTO EXPANDIDO
2 - 3	 16 CELULAS	8 - 9	 BLASTOCISTO LIBRE
2 - 4	 MORULA TEMPRANA.		

DE: Sugie T., Seidel G.E., and Hafez E.S.E., (1980)
 Reproduction in Farm Animals.

CLASIFICACION DE EMBRIONES DE ACUERDO A SU MORFOLOGIA:

Cuando los embriones se encuentran dentro de un determinado rango de desarrollo, algunos aspectos morfológicos son importantes para determinar su futura viabilidad. El tamaño promedio de los blastocistos de ovejas y cabras es de 140 a 185 micras a una edad de 4 a 6 días y su forma es completamente esférica (Wright y Linder, 1983).

Cuando los ovocitos se recuperan en el primer día postcoito, pueden estar sin fecundar o recién fecundados, --- pero cuando su desarrollo se afecta, podemos encontrar, después de algún tiempo cigotos de una sola célula con diferentes grados de degeneración (figura 3), estos no deberán ser utilizados para el trasplante sistemático de embriones ---- (Sugie, et. al., 1980).

Para las etapas más avanzadas de desarrollo embrionario, Linder y Wright (1983) proponen la siguiente clasificación:

- I).-EXCELENTE: El embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme.
- II).- BUENO: Imperfecciones ligeras, como pocos blastómeros alargados, forma irregular, con pocas vesículas.
- III).- REGULAR: Problemas definidos, pero severos, tales como blastómeros irregulares, abundantes vesículas pocas células degeneradas.

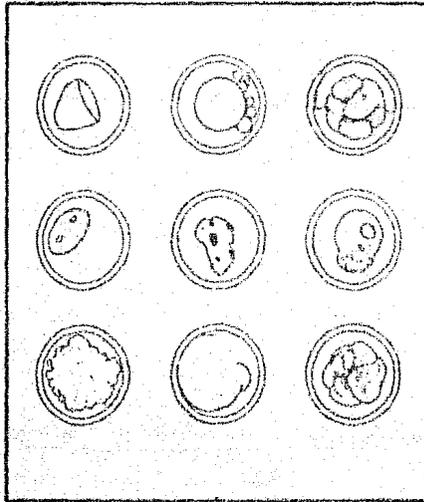
IV).- MALO: Problemas severos, numerosos blastómeros alargados, células degeneradas, células de varios tamaños, gran cantidad de vesículas, pero la masa celular posee una apariencia viable.

La figura 4 muestra algunos tipos de embriones morfológicamente anormales.

También los embriones de los primeros seis días que presentan alguna fractura de la zona pelúcida, tienen poca posibilidad de implantarse (Jillela, 1982).

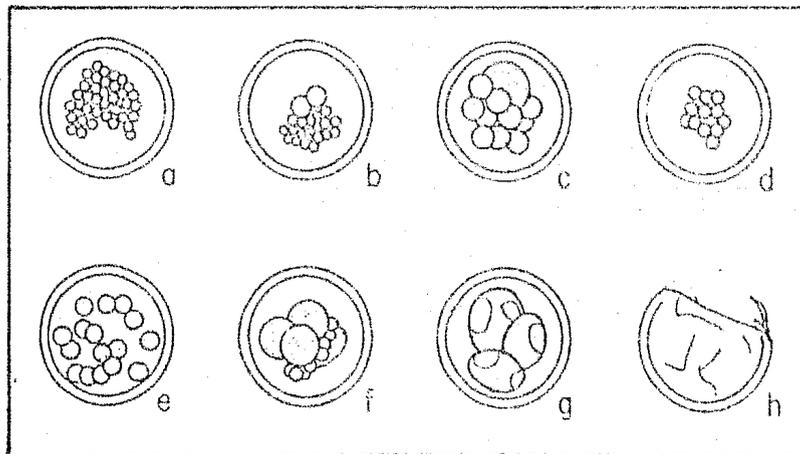
En lo referente a la frecuencia de embriones encontrados en animales sacrificados en el rastro, Betteridge (1980) reporta que de un total de 1232 ovulaciones de bovinos sacrificados, obtuvo 35% de embriones sobre el total de ovulaciones, y el 16% eran óvulos no fertilizados, lo que equivale al 67% del total de ovocitos y embriones recuperados.

FIGURA 3.
EMBRIONES DE UNA CELULA EN DEGENERACION QUE NO DEBEN SER
USADOS PARA LA TRANSFERENCIA RUTINARIA.



TOMADO DE: Sugie T., Seidel G.E. and Hafez E.S.E., (1980).
Reproduction in Farm Animals.

FIGURA 4. EMBRIONES MORFOLOGICAMENTE ANORMALES.



TOMADO DE: Sucie T., Seidel G.E., y Hafez E.S.E., 1980.

- a) MORULA COMPACTA CON LA ZONA PELUCIDA OVAL. b) MORULA CON BLASTOMEROS IRREGULARES.
c) BLASTOMEROS IRREGULARES. d) MORULA CON ESCOMBROS. e) PERDIDA DE BLASTOMEROS.
f) MASA DE CELULAS IRREGULARES. g) VACUOLAS EN EL CITOPLASMA h) ZONA PELUCIDA ROTA Y VACIA.

OBJETIVOS:

Determinar el porcentaje de óvulos y embriones que se pueden recuperar, de órganos genitales de ovejas y cabras, que presenten por lo menos un cuerpo lúteo o un cuerpo hemorrágico y que no se observen aparentemente gestantes, en el momento del sacrificio en el Rastro Municipal de Tlalnepantla Edo. de México.

OBJETIVOS ACADEMICOS.

Capacitar al personal del Laboratorio de Re---
producción e Inseminación Artificial de la Facultad de Estu---
dios Superiores Cuautitlán; en el manejo y clasificación de -
embriones.

MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en el Rastro -- Municipal de Tlalnepantla Edo. de México y en el Laboratorio de Reproducción e Inseminación Artificial de la Facultad de-- Estudios Superiores Cuautitlán, durante el periodo de Noviembre a Junio, cuando se localizan hembras con cuerpos hemorrágicos y cuerpos lúteos sin gestación avanzada.

Se colectaron 100 aparatos genitales de hembras con las siguientes características:

- Recien sacrificadas.
- Con cuerpos hemorrágicos o cuerpos lúteos.
- Que a simple vista no mostraran signos de embriones implantados como asimetría de los cuernos o presencia de líquidos.

Las hembras sacrificadas provenían principalmente de los Estados de México, Guanajuato, Querétaro con una variación en el peso de 30 a 40 kilos y una edad referida como muda dental, de 2 a 8 piezas combinadas.

Durante el periodo de muestreo se colectaron -- los aparatos reproductivos de 60 ovejas y 40 cabras que reunieron los requisitos antes mencionados.

De cada aparato genital, se lavaron los oviductos y los cuernos del lado que presentaban los cuerpos lúteos

Introduciendo una sonda por la fimbria a través de la cual se inyectaron 20 ml. de Solución Hartman que se recolectó por el cervix; introduciendo un cateter de mayor grosor. Cuando las estructuras que indicaban ovulación se encontraban en un solo ovario, se pinzó el cuerpo contralateral para evitar pérdidas embrionarias por reflujo.

El fluido del lavado se recuperó en cajas de plástico o en cajas de Petri a las que se agregó 3 ó 4 gotas de formol al 10% para evitar la destrucción de ovocitos o cigotos.

La localización se realizó en cajas de Petri, cuadrículadas en divisiones de un centimetro cuadrado, bajo el microscopio estereoscópico con un aumento de 70 a 45 X.

Cada embrión localizado, se aisló mediante una pipeta Pasteur, se colocó en un portaobjetos concavo, se tiñó con una gota de eosina amarillenta y se observó al microscopio compuesto a 100 X con el fin de clasificarlo, tomando en consideración a su etapa de desarrollo, tomando como base los reportes de wright y Linder (1983). Una vez clasificados, se almacenaron etiquetados en frascos con 5 ml. de la solución Hartman con formol, para servir como material de prácticas para estudiantes y profesores.

ANALISIS DE RESULTADOS.

En el cuadro número 1 se presentan los resultados obtenidos.

Se detectaron en total 118 puntos de ovulación, de los cuales 61 fueron cuerpos hemorrágicos y 57 cuerpos lúteos.

El total de ovocitos y embriones recuperados fué de 62 lo que equivale al 52.5% respecto al total de puntos de ovulación, no existiendo diferencias entre cabras y ovejas: 26 (52.0%) y 36 (52.9%) respectivamente.

En las cabras se recuperaron 7 ovocitos y 19 cigotos (26.9 y 73.1%). Mientras que en las ovejas la recuperación fué igual en porcentaje, 18 ovocitos y 18 cigotos (50%).

Los cigotos recuperados se encontraron en la siguiente proporción: para cada tipo de desarrollo 15.17%, 15.17%, 36.8%, 26.3% y 5.2% para el caso de los caprinos; siendo mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos expandidos, blastocistos elongados y degeneraciones en el mismo orden. Para los ovinos fué de 27.7%, 38.8%, 11.1%, 11.1%, en el mismo orden.

En el cuadro número 2 se muestran los porcentajes de recuperación de embriones y cigotos, considerando la estructura ovárica presente.

En el caso de las cabras hubo menos recupera -----

16.-

ción durante el metaestro de los animales, es decir, cuando se observaron cuerpos hemorrágicos en el ovario; y en el caso de las ovejas, la recuperación fué independiente de la fase ovárica.

CUADRO Nº 1.- Resultados obtenidos en la recuperación y clasificación de embriones y cigotos en ovejas y cabras después del sacrificio.

	CABRAS		OVEJAS		TOTAL	
	NÚMERO	PORCENTAJE	NÚMERO	PORCENTAJE	Nº	%
TOTAL DE ANIMALES	40	40	60	60	100	100
TOTAL DE PUNTOS DE OVULACION	50		68		118	100
PRESENCIA DE CUERPOS LUTEOS (1)	30		27		57	48.4
PRESENCIA DE CUERPOS HEMORRAGICOS (1)	20		41		61	51.6
TOTAL DE OVOCITOS Y CIGOTOS RECUPERADOS (1)	26	52	36	52.9	62	52.5
TOTAL DE OVOCITOS RECUPERADOS (2)	7	26.9	18	50.0	25	40.3
TOTAL DE CIGOTOS RECUPERADOS (2)	19	73.1	18	50.0	37	59.6
TOTAL DE MORULAS RECUPERADAS (3)	3	15.17	5	27.7	8	21.6
TOTAL DE BLASTOCISTOS TEMPRANOS (3)	3	15.17	2	11.1	5	13.5
TOTAL DE BLASTOCISTOS EXPANDIDOS	7	36.8	7	38.8	14	37.8
TOTAL DE BLASTOCISTOS ELONGADOS	5	26.3	2	11.1	7	18.9
DEGENERADOS (3)	1	5.2	2	11.1	3	8.1

(1).- Porcentajes sobre el total de puntos de ovulación.

(2).- Porcentaje sobre el total de ovocitos y cigotos recuperados.

(3).- Porcentaje sobre el total de cigotos recuperados.

CUADRO Nº 2.- Porcentaje de recuperación de embriones y cigotos en cabras y ovejas, después del sacrificio considerando la estructura ovárica presente:

	OVEJAS		CABRAS	
	C.H.	C.L.	C.H.	C.L.
P. O.	20	30	41	27
REC.	14	12	22	14
% (1)	70 a	40 b	53.6 a	51.8 a

C.H.- Cuerpo Hemorrágico.

C.L.- Cuerpo Lúteo.

P.O.- Puntos de Ovulación.

REC.- Recuperados

(1).- Porcentaje sobre el total de puntos de ovulación.

Letras diferentes en las columnas, representan diferencias significativas Ji cuadrada ($P \leq 0.005$).

DISCUSION:

Los resultados obtenidos para la recolección -- total de embriones y cigotos coinciden con lo reportado por -- Betteridge (1977). Pero es mayor que lo encontrado por Avendaño et. al. (1984), los cuales consiguieron recuperar el 13%, así como Trejo (1983), que trabajó solo con ovejas.

Martínez y Asprón (1984) reportaron resultados -- mayores trabajando con ovejas niperovuladas.

Estos resultados también concuerdan con lo re-- portado por Betteridge (1980), trabajando en las mismas con-- diciones en bovinos,

La variación en los tipos de embriones recupe-- dos, se debe a que no existió control sobre el día del sacri-- ficio con respecto al tipo de estructura ovárica. fué dife--- rente y mayor en ovejas; esto puede deberse a la diferencia-- en el número de animales muestreados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

- 1).- La recuperación de embriones en ovejas y cabras es baja-- aún teniendo el aparato genital separado del cuerpo de la --- donadora.
- 2).- La cantidad de embriones fué mayor que la de ovocitos--- por lo que se debe considerar que el porcentaje de hembras -- aptas para la reproducción, que son sacrificadas es superior-- al determinado por la gestación manifiesta.
- 3).- Los porcentajes de recuperación de embriones, puede ver-- se afectados debido a la falta de práctica en la técnica a - utilizar.
- 4).- Sería recomendable proceder a la recolección en una épo-- ca del año que coincida más estrechamente con el fotoperíodo-- de estas especies.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Avendano E. R., Rosales J.V., Sánchez G., (1984); SUPER--OVULACION Y COLECCION EMBRIONARIA EN CABRAS, memorias de la - reunión de investigación pecuaria en México: 333-335.
- 2.- Betteridge J.K. (ed) (1977). EMBRIO TRANSFER IN FARM ANI--MALS. Ottawa Canadá Dept. Agric. Monograph 16. 92 pp
- 3.- Betteridge J.K. (1980). COLECTION AND. TRANSFER OF EMBRIO FROM CATTLE 10-16 DAYS AFTER OESTRUS.
J. Reproduction fert. 59:205-216.
- 4.- Braden AWH and Baker A.A. (1973) REPRODUCTION IN SHEEP -- AND. CATTLE IN. THE PASTORAL INDUSTRIA OF AUSTRALIA. Sydney - University Press, Australia: 269-302.
- 5.- Eppleston J., (1981). EMBRIO TRANSFER PROCEDURES IN THE - GOAT: PHYSIOLOGICAL AND PROCEDURAL DIFFERENCES IN SUPEROVULA--TION AND TRANSFER BET WEEN SHEEP AND GOATS. IN Embrio Trans--fer in cattle , sheeps and goats. Aust. Soc. Reprod. Biol. -- Australia. 41-43.
- 6.- Jillela D., (1982). EMBRIO TRANSFER TECNOLOGY AND HS APLI--CATION IN DEVELOPING COUNTRIES,
F. A. O.
- 7.- Killen I. D. (1981). EMBRIO TRANSFER PROCEDURES IN THE--SHEEP: THE FACTOR WHICH HAWE A MAJOR INFLUENCE ON SUCCES ---RAFE. IN. Embrio transfer in cattle and goats, Aust. Soc. --REPROD. BIOL. AUSTRALIA. 38-40
- 8.- Linder G. M., And Wright R. W. (1985). BOVINE EMBRIO MOR--PHOLOGY AND EVALUATION. XI annual meting of the international embrio transfer society. Colorado Satate University 21-22
- 9.- Martínez P.A.L. y Asprón P.M.A., (1984). SUPEROVULACION-

Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN OVINOS.
MEMORIAS DE LA REUNION DE INVESTIGACION PECUARIA EN MEXICO.
SARH, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO: 320.

10.- Mc. Laren A., (1980) FECUNDACION, PARTICION E IMPLANTACION. EN. Reproducción e inseminación artificial an animales-4 ta. Edición Interamericana, México: 216-234.

11.- Pineda M.H., and Bowen R. A. (1980). EMBRIO TRANSFER. IN. Veterinary Endocrinology and reproduction. 3th. ed. Lea and febiger, U.S.A.

12.- Sugle T., Seidel G.L. and Hafez E. d.e., (1980), EMBRIO-TRANSFER. IN. Reproduction in animals. 4th ed. Lea. and Febi-ger U.S.A.: 569-594.

13.- Trejo G.A., (1983). Recolección de cigotos en ovejas. MEMORIAS DEL 9NO. CONGRESO PANAMERICANO DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. MACARAY VENEZUELA: 109.

14.-Turner H.N., (1981). THE CASE FOR PRESERVATION OF GENETIC MATERIAL BY EMBRIO COLLECTION PROCEDURES. IN. Embrio transfer in cattle, sheep and goats. Aust.Soc. Reprod. Biol. Australia: 68-70.

15.- Willadsen S.M., (1979). TRANSPLANTE DE EMBRIONES EN LAS-OVEJAS EN. Manejo y enfermedades de las ovejas. Editorial --- Acribia Zaragoza España: 76-91.

16.- Wright R.W., and Linder G.M., (1983). COMPARATIVE MORPHOLOGY OF EMBRIOS. XI Annualmeeting of the International Embrio-Transfer Society . Colorado State University: 13-20.