

75  
24

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

PORCENTAJES DE CONCEPCION CON EMBRIONES FRESCOS  
Y CONGELADOS EN ESTADIOS DE MORULA, BLASTOCISTO  
TEMPRANO Y BLASTOCISTO, CALIDADES 1, 2 Y 3 TRANS-  
FERIDOS NO QUIRURGICAMENTE EN BOVINOS LECHEROS.

## T E S I S

Que para obtener el Título de  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

JORGE EDUARDO GARCIA ROMERO



A s e s o r e s :

M.V.Z. ARTURO SANCHEZ ALDANA PEREZ

M.V.Z. MOISES PEÑA VERDUZCO

M.V.Z. EVERARDO ANTA JAEN

México, D. F.

1989

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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

RESUMEN .....	V
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	5
RESULTADOS.....	14
DISCUSION.....	17
CONCLUSIONES .....	23
ANEXO .....	25
LITERATURA CITADA .....	26

## RESUMEN

Con el fin de conocer las tasas de concepción que se pueden lograr en México con la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos frescos y congelados - descongelados en estadios de Mórula, Blastocisto temprano y Blastocisto, calidades 1,2 y 3 y compararlos entre sí para establecer cuales de éstos ofrecen mayores posibilidades de gestación se realizaron 1,203 transferencias en el Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones - LICONSA . La recolección de embriones se realizó por el método no quirúrgico con Solución de Dulbecco Fosfato - Salina Bufferada con 0.2 % de Albúmina sérica bovina; la evaluación embrionaria fué con la técnica de Evaluación Morfológica y la congelación, cuando se realizó, se llevó a cabo con una máquina congeladora de embriones RPE Freezer. Los resultados fueron analizados con una prueba Exacta de Fisher y se discuten los hallazgos de la sincronía embrión - receptora, calidad embrionaria y si sufrierón el proceso de congelación - descongelación o no; encontrándose que con los embriones evaluados en estadio de Blastocisto, frescos y clasificados como calidad uno se obtuvo la mejor tasa de concepción ( 62.5 % ).

## INTRODUCCION

México en los últimos años ha tenido una balanza comercial de la leche y productos lácteos deficitaria, siendo para 1980 de 38.6 millones de dólares y en 1985 de 151.1 millones de dólares ( 25 ); y no obstante el fuerte incremento que han tenido las importaciones de leche, la población con ingresos inferiores al salario mínimo sufre un déficit de casi 50% respecto al consumo mínimo recomendable ( 25 ). Para satisfacer esos mínimos recomendables habría que producir 2.5 millones más de litros de leche diariamente, equivalentes a un aumento del 12% de la disponibilidad actual ( 25 ).

Para resolver dicho déficit se requiere: aumentar el número de animales en explotación y/o aumentar la producción de leche por animal ( 28 ). Para lo cual es necesario aprovechar al máximo todos los recursos tecnológicos como lo es, entre otras prácticas zootécnicas, la transferencia de embriones; misma que permitiría mejorar la calidad genética del Hato Nacional reduciendo el intervalo generacional ( 8, 34 ) e incrementando la intensidad de selección ( 33 ) además de ser un medio efectivo para importar ganado con alto potencial genético ( 34 ) y ofrecer perspectivas aún en fase de desarrollo muy atractivas como la producción de gestaciones con embriones bipartidos o sexados ( 8, 21 ).

Sin embargo aun cuando la transferencia de embriones es ya una técnica comercial debe ser eficiente en cuanto a costos y resultados y uno de los parámetros quizás el más importante para medir dicha eficiencia es el porcentaje de concepción.

Existen varios factores que afectan el porcentaje de gestación en la transferencia de embriones siendo los principales : estadio del embrión, calidad morfológica y si se transfiere en fresco o congelado-descongelado ( 31 ). Donaldson ( 5 ), Liehman y Fulka ( 23 ), Linder ( 24 ) así como Newcomb y Rowson ( 27 ) mencionan que es más conveniente poner atención en la sincronía estadio del embrión - receptora que en la sincronía donadora - receptora ya que encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de concepción logrados con los diferentes estadios de los embriones, reportando Hasler et al. ( 17 ) un 71.0%, 77.0% y 75.0% para los estadios de Mórula, Blastocisto temprano y Blastocisto respectivamente (  $P < 0.025$  ). Por otra parte Heyman ( 17 ), Elsdon ( 10 ), Hasler et al. ( 17 ), Takeda et al. ( 35 ), Shea ( 32 ) y Wright ( 36 ) observaron que la sobrevivencia del embrión transferido dependen de la viabilidad de las células de éste, la cual se pretende establecer en base a la evaluación morfológica ( 24 ); encontrando Donaldson ( 5 ) una reducción del 13.3 % en los porcentajes de concepción por cada disminución de la calidad del embrión. En cuanto si se transfieren embriones frescos o congelados - descongelados Heyman ( 18 ), Leibo ( 22 ), Liehman y Fulka ( 23 ) se percataron que con embriones que

sufrían el proceso de congelación - descongelación se obtenían menores porcentajes de concepción notificando Screenán y Diskin ( 31 ) que el método más eficiente de congelación - descongelación mata del 10 al 20 % de los embriones empezando las pérdidas en aquellos de baja calidad.

Por lo anterior ¿ cuales embriones transferir ? : ¿ en que estadios ?, ¿ Que calidades ? y si ¿ frescos y/o descongelados ?. El conocimiento de los tres factores arriba considerados bajo las condiciones actuales de nuestro país, puede ser de utilidad para predecir porcentajes de éxito en la transferencia de embriones ( 5 ).

El Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones-LICONSA cuenta con las condiciones propicias para desarrollar la transferencia de embriones a nivel comercial masivo en México por lo cual puede ofrecer un marco de referencia.

El objetivo del presente trabajo es determinar los porcentajes de concepción logrados en dicho Centro con la transferencia no quirúrgica de embriones frescos y congelados - descongelados en estadios de Mórula, Blastocisto temprano y Blastocisto, calidades 1, 2 y 3 y compararlos entre sí para establecer cuales de éstos ofrecen mayores posibilidades de concepción.

La técnica de transferencia empleada fué la no-quirúrgica y para la evaluación de los embriones se empleo la llamada "Evaluación Morfológica" por considerarse las más fáciles de emplear en condiciones de campo ( 6,9 ).

Cuando se refiere en el presente trabajo a embriones frescos (F) se trata de aquellos embriones que se transfirieron sin haber sufrido un proceso de congelación - descongelación ( C-D ).

La Evaluación Morfológica utiliza números para designar los estadios embrionarios así a las Mórulas se les identifica con un 4, a los Blastocistos tempranos con un 5 y a los Blastocistos con un 6 misma nomenclatura que se empleará en el presente trabajo.\*

-----

\* Los números 0,1,2 y 3 identifican : zona pelúcida sin ningún contenido, óvulo, embrión de 2 hasta 16 células aproximadamente y Mórula temprana respectivamente (24).

## MATERIAL Y METODOS.

Los embriones se obtuvieron en el Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de embriones ( CEMEGEN ) - LICONSA, ubicado en Tepetzotlán, Estado de México, dentro de las coordenadas 19° 43' Latitud Norte, 94° 14' Long. Oeste ; con una altitud de 2,450 m.s.n.m. bajo condiciones de un clima templado subhúmedo con lluvias en verano C (WO) (W) b (i) con una variación media de temperatura 5 a 24 ° C y con una precipitación de 610.6 mm. ( 15 ).

Dichos embriones se obtuvieron dentro del programa normal de trabajo que el mencionado Centro lleva a cabo y que a continuación se describe.

Se utilizan como donadoras vacas y vaquillas ( entendiéndose como éstas a animales que no hayan parido ) de buena calidad genética ( 13, 30 ) de las razas Holstein Friesian y Pardo Suizo Americano.

Dichos animales son sometidos a detección de estro por personas capacitadas para ello dos veces al día, al amanecer y al anochecer ( 30 ) y una vez que han presentado por lo menos dos calores regulares se procede a su selección y designación de dosis superovulatoria, la cual ocurre del sexto al décimo día después de haber presentado el último estro ( 30 ) tomando los

siguientes criterios: deben estar en perfecto estado de salud ( 8,30 ), no gestantes y con la presencia de un cuerpo hemorrágico o láteo funcional en cualquier de sus ovarios ( 1,8 ). Cumpliendo esos requisitos los animales se superovulan utilizando Hormona Folículo Estimulante - 1 - ( F.S.H.-P. ) en dosis que varían de 24 a 50 mg dependiendo de la edad y/o peso del animal y de como hayan respondido a tratamientos previos en el caso de haberseles superovulados antes. La cantidad total de F.S.H.- P. -1 - designada por animal se aplica en un régimen de dosis decrecientes a lo largo de cuatro días con intervalos de 12 hrs aplicando al tercero Dinoprost - trometamina - 2 - 25 mg en la mañana y 25 mg en la tarde ( 1 ). Se espera que los animales entren en celo al quinto día después de iniciado el tratamiento ( 8 ). Se procede a inseminar artificialmente a los animales donadores a las 12 y 24 hrs después de haberseles detectado el estro ( 2 ). Para lo anterior se usa semen proveniente de toros probados congelado en pajilla francesa ( 2 ). Al séptimo día después de haber presentado el calor las donadoras se recolectan los embriones utilizando el método no quirúrgico ( 9 ) para lo cual :

- se inmovilizan en una trampa de manejo ( 6 ), en donde se les

-----  
1 Schering Co.

2 "Lutalyse" Tuco.

- realiza la asepsia de la región perivulvar abarcando el área para hacerles la analgesia epidural ( 6 ) ( la cual se hace utilizando lidocaína al 2% preparada en el CEMEGEN),
- se introduce por la vulva del animal una sonda Foley - 1 - del calibre adecuado ( 18 a 22 ) a la cual : se le da rigidez por medio de un estilete de acero inoxidable, se le protege con una camisa sanitaria de plástico ( la cual se rompe al " conectar " la sonda con la os externa del cervix ) y se le manipula mediante una mano introducida en el recto de la donadora ( 6 ),
  - la recolección se hace primero en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con mayor respuesta ( aquel que a la palpación presente el mayor número de cuerpos lúteos ) ( 6 ),
  - la sonda se fija al cuerno mediante el globo de la misma ( procurando que quede colocado a la altura de la curvatura mayor de dicho cuerno ) ( 6 ),
  - hecho lo anterior se retira el estilete y la sonda se conecta a una manguera "tigón" la cual en uno de sus extremos se une al filtro concentrador de embriones - 2 - y el otro extremo al frasco que contiene el medio de recolección ( Solución de Dulbecco Fosfato - Salina Bufferada - PBS - 3 - ; con 0.2% de albúmina sérica bovina ) ( 6 ),

-----  
1 Adex  
2 Em. Con.  
3 GIBCO

- se permite la entrada del medio hasta dilatar medianamente el cuerno uterino dándole posteriormente un masaje gentil. Terminando éste se deja salir el medio hacia el filtro y se repite dicha operación aproximadamente 5 veces ( 6 ),
- se repite el mismo procedimiento para el otro cuerno uterino.

Una vez concluida la recolección se procede a la búsqueda de los embriones en el laboratorio vaciando el contenido del filtro en una caja de Petri cuadrículada con capacidad de 50 ml ( 6 ), en donde se realiza la búsqueda de los embriones a 12X en un microscopio estereoscópico.

Una vez localizados los embriones son evaluados por técnicos capacitados para ello a 50X en un microscopio estereoscópico ( 6 ). Para realizar lo anterior se usa la técnica de Evaluación Morfológica ya que las pruebas de exclusión de colorantes, medición de actividad enzimática, captación de glucosa y las tinciones vitales son de poco valor para las condiciones de transferencia en campo ( 24 ). Se considera un embrión en estadio Mórula ( Mórula tardía compacta ) cuando los blastómeros, aproximadamente 64, se hayan unido formando una masa compacta que ocupe del 60 a 70% del espacio perivitelino ( 7, 24 ). A un embrión en estadio de blastocisto temprano ( 5 ) cuando exista una cavidad llena de líquido ( Blastocelo ), el embrión de una

aparición general de anillo que ocupe del 70 al 80% del espacio perivitelino y que pueda ser posible una diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa de células interna ( 7,24 ). A un embrión en estadio de Blastocisto ( 6 ) cuando exista una pronunciada diferenciación de las capas trofoblástica externa y la mayor compactación de la masa de células interna así como cuando el blastocele ocupe la mitad o más del embrión ( 7,24 ).

Para evaluar la calidad embrionaria se utilizan los siguientes parámetros: forma, color, número y compactación celular, tamaño del espacio perivitelino, número de células extruidas y degeneradas y número y talla de las vesículas ( 7,26 ). Se le designa a un embrión la calidad 1 cuando es esférico, simétrico, con células de talla, color y textura uniforme que tenga más del 98% de las células de la masa celular aparentemente activas y sanas y no existen blastómeros extruidos ( 7,26 ). La calidad 2 cuando tienen de 70 al 98% de las células de la masa celular aparentemente activas y sanas, tengan pocas imperfecciones triviales como escasos blastómeros extruidos, ligera forma irregular y con pocas vesículas ( 7,26 ). La calidad 3 cuando tienen menos del 70% de las células de la masa celular aparentemente activas y sanas, problemas definidos pero no severos como presencia de blastómeros extruidos, vesiculación y algunas células degeneradas ( 7,26 ). La calidad 4 ( o degenerado ) cuando existen numerosos blastómeros extruidos, células de tallas variables y/o degeneradas así como numerosas y grandes vesículas ( 7,26 ).

Para la búsqueda y la evaluación de los embriones se utiliza como medio de mantenimiento PBS.

Para transferir en "fresco" se emplea PBS + 0.4% de Albúmina sérica bovina ( ABS ) ( previo "lavado" de éstos en 10 gotas de dicho medio ) ( 3 ). El mismo medio se utiliza para transferir los embriones descongelados ( 3 ).

Los embriones que se seleccionan para ser congelados son calidad 1 y 2 ( 3 ) y para hacerlo :

- se "lavan" los embriones pasándolos por diez gotas de medio de mantenimiento ( 3 ),
- se ponen en PBS + 0.4% de ASB +10% de glicerol durante 10 minutos ( 3 ),
- se colocan en pajillas francesas de 0.25 cc para lo cual: se succiona una columna de medio de congelamiento, una burbuja de 3 a 4 mm, otra columna de medio de aproximadamente 15 mm, una segunda burbuja de aire y una columna de medio en donde se coloca el embrión. Esta última columna deja en el extremo de la pajilla un espacio de 15 mm, mínimo. Se sella el extremo por calor ( 3 ),
- "empajillados" los embriones se colocan en una máquina congeladora de embriones - 1 - manual. Para proceder a su congelación: se empieza a 0 grados C bajando 1.0 grados C /min hasta llegar - 7 grados C, se induce la cristalización con pinzas de disección previamente enfriadas en nitrógeno líquido ( la pajilla se pinza a nivel del menisco superior de

la columna que contiene el embrión ), se mantiene la temperatura a - 7 grados C durante 10 min con el fin de permitir un tiempo amplio para la cristalización, cumplido el tiempo se baja la temperatura hasta -30 grados Centígrados a una velocidad de 0.5 grados C /min, a - 30 grados C las pajillas se sumergen inmediatamente en un recipiente convenientemente lleno de nitrógeno líquido ( 14 ).

Para descongelar: se saca la pajilla del termo con nitrógeno, se deja transcurrir 6 seg y se coloca en agua a 37 grados C por 20 seg. Se localiza el embrión dentro de la pajilla y se saca de esta poniendose, secuencialmente, por las siguientes soluciones:

- PBS + 0.4% de ASB + 6% de glicerol + 0.3 molar de sacarosa,
- PBS + 0.4% de ASB + 3% de glicerol + 0.3 molar de sacarosa,
- PBS + 0.4% de ASB + 0.3 molar de sacarosa, y
- PBS + 0.4% de ASB ( 3 ).

-----  
1 RPE Freezer

El embrión permanece 5 min en cada una de ellas ( aprovechando éste tiempo para hacer su re-evaluación ) ( 3 ).

Los embriones a los que hace referencia el presente trabajo fueron transferidos en el CEMEGEN a animales ( "receptoras" ) que presentaron calor 6.5 a 7.5 días antes ( 11 ).

Los embriones que se transfieren en el CEMEGEN se colocan en pajillas de 0.25 cc de la siguiente manera: se succiona una columna de medio de 1 cm aproximadamente ( la cual toca uno de los algodones de la pajilla ), una burbuja de aire de 0.3 a 0.4 cm, otra columna de medio, otra burbuja de aire, una columna de medio de aproximadamente 3 cm ( donde va el embrión ), otra burbuja de aire y se termina el llenado de la pajilla con una última columna de medio ( 3 ). La pajilla se acomoda en un aplicador de Cassou para transferencia de embriones, cubriéndose éste con una funda ex-profeso y a ésta se le protege con una camisa sanitaria de plástico. Se lleva al animal a transferir, el cual previamente se inmoviliza en una trampa y se le provoca la analgnesia epidural ( anterior asepsia del área - abarcando la región perivulvar - ) ( 11 ).

El aplicador de Cassou se manipula con una mano introducida en el recto de la receptora, se rompe la camisa sanitaria al "conectar" la os externa del cérvix, se conduce hasta alcanzar

el cuerpo uterino y de ahí al cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo ( previamente diagnosticado ) procurando no lastimar el endometrio ( 11 ). La receptora además de haber tenido un cuerpo lúteo funcional debió cumplir con los siguientes requisitos : haber presentado por lo menos dos calores regulares y estar en perfecto estado de salud ( 8,30 ).

Desde la recolección, en caso de embriones frescos, o desde la descongelación a la transferencia se procuró que no transcurrieran más de 2 hrs ( 3 ).

Los diagnósticos de gestación se hicieron por examen tocológico a los 45 días después de realizadas las transferencias ( 37 ). Los resultados de gestación por estadio y calidad para embriones frescos y congelados-descongelados se analizaron utilizando la prueba exacta de Fisher ( 26 ).

## RESULTADOS

Se realizaron 1,203 transferencias : de los cuales 831 fueron con embriones en estadio de Mórula, 225 en estadio de Blastocisto temprano y 147 con Blastocistos. De las 1,203 transferencias 588 fueron utilizando embriones frescos y 615 embriones congelados-descongelados, 166 de calidad uno, 885 calidad dos y 152 calidad tres.

Los porcentajes de concepción logrados son los que se exponen en las tablas número 1 y la, en donde se observa que el mejor porcentaje de gestación se obtuvo con los embriones ( 6-1 )F, y en orden decreciente con los ( 5-3 )F, ( 6-2 )F, ( 5-1 )F y ( 5-1 )C es decir las cuatro mejores tasas de concepción se lograron con Blastocistos y Blastocistos Tempranos. También en dichas tablas puede observarse que los embriones frescos obtuvieron mejor porcentaje de gestación que los congelados; que existió un decremento en los porcentajes conforme lo hubo en las calidades y que los Blastocistos lograron mejores tasas de gestación que los Blastocistos tempranos y éstos, a su vez, que las Mórulas.

Observando la Tabla del Anexo. Podemos notar que existió significancia estadística (  $P < 0.05$  ) entre los porcentajes de gestación logrados con los embriones frescos y congelados ; entre los Blastocistos y los Mórulas ; entre los ( 5-3 )F y los ( 6-3 )F ; entre los ( 6 - 1 )F y los ( 6-3 )F ; entre los ( 6-1 )F y los ( 6-3 F ); entre los ( 4-1 )C y los ( 4-3 )C ; entre los ( 4-2 )C y los ( 4-3 )C y entre los ( 4-2 )F y los ( 4-2 )C.

TABLA No. 1  
 PORCENTAJES DE CONCEPCION  
 LOGRADOS CON EMBRIONES BOVINOS TRANSFERIDOS NO QUIRURGICAMENTE

ESTADIO	4 (Mórula)			5 (Blastocisto Temprano)			6 (Blastocisto)				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
FRESCOS	(39) 15 35.90%	(338) 145 43.11%	(65) 20 30.76%	(12) 6 50%	(99) 36 40%	(7) 4 57.14%	(8) 5 62.5%	(23) 12 52.17%	(10) 8 80%	(588) 283 48.13%	TOTAL FRESCOS %
CONGELADOS	(57) 23 40.35%	(286) 89 31.11%	(50) 8 16%	(21) 10 47.61%	(84) 33 39.26%	(11) 2 18.18%	(29) 10 34.48%	(68) 31 45.59%	(9) 2 22.22%	(615) 208 33.82%	TOTAL CONGELA- DOS %
	(96) 15+23=38 39.58%			(33) 6 + 10 = 16 48.48%			(37) 5+10=15 40.54%			(166) 38+16+15 = 69 41.56%	TOTAL CALIDAD UNO %
		(628) 145+89 = 234 37.74%			(174) 36+33 = 69 39.65%			(91) 12+31 = 43 47.25%		(485) 234+69+43 = 346 39.89%	TOTAL CALIDAD DOS %
			(115) 20+8=28 24.34%			(18) 4 + 2=6 33.33%			(19) 9+2=2 10.52%	(152) 28+6+2+36 = 72 23.68%	TOTAL CALIDAD TRES %
	(831) 38 + 234 + 28 = 300 36.10% ± 0.315			(225) 16 + 69 + 6 = 91 0.404 ± 7.41			(147) 15 + 43 + 2 = 60 0.416 ± 9.55%			(1203) 61 37.48%	TOTAL ESTADIOS %

EL NUMERO ENTRE PARENTESIS INDICA EL NUMERO DE OBSERVACIONES REALIZADAS.

EL NUMERAL DEL MEDIO INDICA EL NUMERO DE OBSERVACIONES CON RESULTADO EXITOSO.

TABLA NUMERO 1 A.

PORCENTAJES DE CONCEPCION

LOGRADOS CON EMBRIONES BOVINOS TRANSFERIDOS NO QUIRURGICAMENTE.

ESTADIO	4 (Mórula)	5 (Blast.Temp.)	6 (Blastocisto)
F R E S C O S	(438)	(109)	(41)
	180	46	17
	41.096%	42.202%	41.463%
C O N G E L A D O S	(393)	(116)	(106)
	120	45	43
	30.534%	38.793%	40.566%

EL NUMERO ENTRE PARENTESIS INDICA EL NUMERO DE OBSERVACIONES REALIZADAS.

EL NUMERAL DEL MEDIO INDICA EL NUMERO DE OBSERVACIONES CON RESULTADO EXITOSO.

## DISCUSION

En el presente análisis se observo, cuadro 1, que excepto con los Blastocisto tempranos frescos los menores porcentajes de concepción fueron con los embriones calificados como calidad 3 aunque sólo hubo significancia estadística ( $P < 0.05$ ) entre los embriones : ( 6-1 ) F y ( 6-3 ) F; ( 6-2 ) F y ( 6-3 ) F; ( 4-1 ) C-D y ( 4-3 ) C-D y entre los ( 4-2 ) C-D y los ( 4-3 ) C-D. Los porcentajes de los calidad 3 congelados - descongelados fueron los menores entre los estadios de Mórula y Blastocisto temprano y en los Blastocisto si bien el menor porcentaje fué con los embriones calidad 3 este no fue con los congelados - descongelados sino con los frescos. Aunque entre los embriones clasificados como calidad 1 y 2 no se encontró una mejor tendencia hacia los calidad 1 en todos los casos (tabla del anexo) como cabría esperarse, comparando los calidad 1 y 2 con los calidad 3 sí hubo una mejor tendencia hacia aquellos por lo que se ve la conveniencia de la clasificación embrionaria y la no posible transferencia de aquellos embriones clasificados como calidad 3. Quizás el que no se hayan logrado siempre mejores tasas de preñez con los embriones calificados como calidad 1 se deba a que el embrión al proseguir su desarrollo sea capaz de recuperarse de las imperfecciones que determinaron al técnico evaluador clasificarlo como calidad 2 como de vez en cuando puede observarse en algunos embriones. Ejemplo de lo anterior son ciertas Mórulas en donde se aprecia una masa celular bien compactada ocupando casi un 70 % del espacio perivitelino no

obstante de existir alguno o algunos blastómeros extruidos los cuales por su tamaño se pensaría que detuvieron su desarrollo en un estadio temprano de 2, 4 ó 8 células, o en aquellos blastocistos cuyo blastocele oprime a un blastómero extruido contra la membrana vitelina. Caso similar puede ocurrir en un embrión clasificado como 1 pero al continuar con su evolución algún o algunos de sus blastómeros o células detienen su metabolismo. Lo anterior puede ocurrir, quizás, debido a la incapacidad de la técnica de evaluación morfológica de determinar con exactitud el grado de viabilidad del embrión ( 24 ). Sin embargo cuando el daño embrionario determinado por la técnica abarque más del 30 %, es decir el embrión presente :blastómeros extruidos, vesiculación y algunas células degeneradas; a pesar de que el embrión pueda conducir a una gestación sus probabilidades tal vez sean menores que los clasificados como calidad 1 ó 2 (debido quizás al menor porcentaje de embriones que logran recuperarse de tales daños).

Aunque se reporta una disminución del 13.3% en los porcentajes de gestación por cada disminución de la clasificación otorgada al embrión ( 5 ) las disminuciones encontradas en el presente trabajo fueron muy variables ( del 100 al 16.522%, Tabla 1 ) e incluso entre las Mórulas frescas calidad 1 y 2, Blastocistos tempranos frescos calidad 2 y 3 y los Blastocistos congelados calidad 1 y 2 se encontrarán aumentos ( Tabla 1 ).

Solo si se engloban los resultados de los embriones transferidos por calidad ( Tabla 1, columna de la extrema derecha) sin considerar estadio ni si fuerón transferidos frescos o congelados - descongelados los resultados muestran una disminución lógica siendo esta de 5.942 % de los calidad 1 a los 2 y de los calidad 2 a los 3 de 39.421 % .

En cuanto a las tasas de gestación considerando si el embrión fue sometido a un proceso de congelación - descongelación o no comparando el mismo estadio y la misma calidad ( Tabla 1 ) se observaron resultados variables. Se obtuvo desde una disminución del 1.785 % entre los Blastocistos tempranos calidad 2 lo que concide con Elsdén ( 15 ) en donde reporta una pérdida en los porcentajes de concepción menores al 2 % debido a la congelación - descongelación , hasta 68.181 % resultado también obtenido con los Blastocisto tempranos en esta ocasión calidad 3 y lo que va de acuerdo con Sreenan y Diskin ( 31 ) los cuales mencionan que serán mayores las pérdidas debidas a la congelación - descongelación en aquellos embriones clasificados como de menor calidad . Sólo hubo significancia estadística (  $P < 0.05$  ) entre las Mórulas calidad 2 (Tabla del Anexo ). Se obtuvieron en dos casos resultados mejores con los embriones congelados siendo estos con los embriones en estadio de Mórula clasificados como calidad 1 y en los embriones determinados Blastocistos de calidad 3 (Tabla 1) . A pesar de ello cuando conjuntamos todos los

resultados (Tabla 1) es decir sin importar estadio o calidad sino solo si fueron congelados - descongelados no se obtuvo una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ , Tabla del Anexo) favorable a los embriones transferidos frescos. La disminución en el porcentaje de gestación debido al proceso de congelación - descongelación fué del 18.16 % lo que estaría entre el rango del 10 al 20 % considerado como normal por la literatura ( 31 ).

En la observación estadio - tasa de concepción ( sincronía embrión - receptora ) sólo se encontró diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ , Tabla del Anexo) entre los embriones en estadio de Blastocisto temprano y Blastocisto frescos calidad 3. En la totalización de los resultados ( último reglón de la Tabla 1 ) es decir no considerando calidad ni si fueron congelados - descongelados se encontró diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$  Tabla del Anexo) entre los embriones en estadio de Mórula y Blastocisto ésto quizás a que los Blastocistos corresponden a un desarrollo más esperado al séptimo día después del estro que las Mórulas. Lo anterior va de acuerdo con la literatura que reporta que existe mayor conveniencia en fijar la sincronía embrión - receptora en vez de fijarla entre la donadora - receptora ( 5, 23, 24, 27 ). Como se mencionó en los Resultados se logró el mejor porcentaje de concepción con los Blastocistos frescos calidad 1 ( Tabla 1 ) sin embargo al inicio del presente trabajo se pensaba que sería el segundo mejor porcentaje después del de los Blastocistos tempranos.

Lo anterior se suponía puesto que los Blastocistos tempranos corresponden a un desarrollo más esperado al séptimo día después de haber presentado el estro la vaca ( 7 ) pero hemos de considerar que los Blastocistos tempranos sólo difieren de los Blastocistos en horas ya que a estos se les esperar encontrar en mayor porcentaje a los 7.5 días después de haber manifestado el celo la hembra ( 7,24 ). Cabe aquí mencionar que a veces no se logra determinar el inicio del estro al igual que su final en la hembra bovina. De todas formas un Blastocisto es un embrión que ha mostrado cierta capacidad para seguir su desarrollo como indica la diferencia estadística significativa (  $P < 0.05$  ) encontrada en el presente trabajo entre los embriones en estadio de Mórula y los Blastocistos.

Si bien no se alcanzaron resultados tan favorables como en algunos trabajos reportados ( por ejemplo en trabajo de Hasler et al. - 17 - ) consideramos que fueron promisorios si consideramos que las tasas de concepción logradas con inseminación artificial al primer servicio son frecuentemente sólo del 50 % ( 20 ).

Aunque gestar a una hembra mediante transferencia de embriones resulta caro cuando se compara con el costo de gestarla utilizando inseminación artificial ( \$ 469,500.00 \* pesos hembra gestante por medio de transferencia de embriones contra \$ 132,544 \* pesos

-----  
\* Cierre contable Septiembre 1989 CEMEGEN - LICONSA

hembra gestante por medio de inseminación artificial si consideramos un costo de producción por embrión de \$ 165,000 \* pesos y \$ 12,000 \* pesos por cada transferencia requiriendo 2.7 embriones por gestación y un costo promedio por dosis de semen de \$ 66,272 \* pesos necesitando 2 dosis para gestar una hembra; lo anterior suponiendo un porcentaje de gestación para la técnica de transferencia de embriones de 37 % y para la de inseminación artificial del 50 % ) se matiza dicho costo cuando vemos el posible cambio genético para producción de leche por año que se puede lograr con dicha técnica ( 1.8 a 2.4 % utilizando transferencia contra 0.2 a 1.1 % utilizando inseminación artificial - 19 - ). El mayor cambio genético posible utilizando la transferencia de embriones se debe, entre otras causas, al menor intervalo generacional que se puede lograr con el empleo de dicha técnica el cual también podría dar mayor margen para realizar ajustes en la producción con el fin de hacer frente a los cambios en la demanda y precios del mercado. Ajustes que por otro lado son mínimos en explotaciones con una sola línea de producción altamente especializada como lo es la lechera - 29 - ( la técnica, además, podría dar cierta diversidad a la empresa ).

El hecho de que en ocasiones se hayan obtenido mayores porcentajes de éxito con embriones de menor calidad y con embriones que sufrieron el proceso de congelación - descongelación podría sugerir la existencia de otros factores involucrados ( 24 ).

## CONCLUSIONES

La transferencia de embriones puede ayudar a mejorar lo que menciona Hammond ( 16 ) como los tres factores principales de la fertilidad de la hembra:

1 ) el número de óvulos liberados ( ovulados )

2 ) el número de óvulos fertilizados y

3 ) el número de embriones desarrollados hasta el nacimiento, factores importantes ya que inciden sobre la tasa reproductiva de la especie aumentándola. Dicho aumento nos puede permitir reducir el intervalo generacional ( 8,34 ) e incrementar la intensidad de selección ya que ambas están relacionadas entre sí y dependen de dicha tasa ( 33 ). Es decir la transferencia de embriones es una herramienta más que nos puede permitir cambiar las frecuencias genéticas lo que puede contribuir a resolver el déficit de leche mencionado en la introducción del presente trabajo.

- Con la transferencia de embriones se pueden lograr tasas " comerciales " de concepción con ventajas genéticas.
- Es conveniente cuidar la sincronía embrión - receptora.
- La Evaluación morfológica es una técnica útil para desarrollar la transferencia de embriones a nivel de campo que nos permite seleccionar los embriones más viables a utilizar para transferir.
- Quizás sea conveniente la no transferencia de aquellos embriones a los que se les clasifique como calidad 3.

- Los embriones congelados - descongelados ofrecen buenas tasas de concepción lo cual es importante para la difusión de la técnica.
- Aunque no estadísticamente significativa se observó en el presente trabajo una mejor tendencia a proseguir su desarrollo en los embriones en estadio de Blastocisto fresco y clasificados como calidad 1

Sería conveniente continuar con este tipo de análisis para poder determinar los factores que afectan los porcentajes de gestación de la transferencia de embriones no quirúrgica en bovinos lecheros.

## ANEXO

## RESULTADOS DE COMPARAR CADA PAR DE PROPORCIONES POR LA PRUEBA EXACTA DE FISHER

COMPARACION	PROPORCION	2F	CONCLUSION
(4-1)F ; (5-1)F	35.897 ; 50	0.583568	N.S.
(4-1)F ; (6-1)F	35.897 ; 62.5	0.316963	N.S.
(5-1)F ; (6-1)F	50 ; 62.5	0.905612	N.S.
(4-2)F ; (5-2)F	43.413 ; 40	0.081214	N.S.
(4-2)F ; (6-2)F	43.413 ; 52.174	0.543669	N.S.
(5-2)F ; (6-2)F	40 ; 52.174	0.412352	N.S.
(4-3)F ; (5-3)F	30.769 ; 57.143	0.323857	N.S.
(4-3)F ; (6-3)F	30.769 ; 0	0.070569	N.S.
(5-3)F ; (6-3)F	57.143 ; 0	0.02	S.
(4-1)C ; (5-1)C	40.351 ; 47.619	0.171789	N.S.
(4-1)C ; (6-1)C	40.351 ; 34.483	0.16295	N.S.
(5-1)C ; (6-1)C	47.619 ; 34.483	0.149905	N.S.
(4-2)C ; (5-2)C	31.119 ; 39.286	>0.187569	N.S.
(4-2)C ; (6-2)C	31.119 ; 45.588	>0.188901	N.S.
(5-2)C ; (6-2)C	39.286 ; 45.588	>0.193548	N.S.
(4-3)C ; (5-3)C	16 ; 18.182	>0.654896	N.S.
(4-3)C ; (6-3)C	16 ; 22.222	>0.6	N.S.
(5-3)C ; (6-3)C	18.182 ; 22.222	>0.817337	N.S.
(4-1)F ; (4-2)F	35.897 ; 43.413	>0.490768x10 <sup>12</sup>	N.S.
(4-1)F ; (4-3)F	35.897 ; 30.769	>0.293581	N.S.
(4-2)F ; (4-3)F	43.413 ; 30.769	0.076486	N.S.
(5-1)F ; (5-2)F	50 ; 40	>0.3886	N.S.
(5-1)F ; (5-3)F	50 ; 57.143	>0.7	N.S.
(5-2)F ; (5-3)F	40 ; 57.143	>0.41632	N.S.

CONTINUA . . .

COMPARACION	PROPORCION	2F	CONCLUSION
(6-1)F ; (6-2)F	62.5 ; 52.174	>0.51051	N.S.
(6-1)F ; (6-3)F	62.5 ; 0	0.013072	S.
(6-2)F ; (6-3)F	62.5 ; 0	0.007621	S.
(4-1)C ; (4-2)C	40.351 ; 31.119	>0.097066	N.S.
(4-1)C ; (4-3)C	40.351 ; 16	0.00958	S.
(4-2)C ; (4-3)C	31.119 ; 16	0.037911	S.
(5-1)C ; (5-2)C	47.619 ; 39.286	>0.305187	N.S.
(5-1)C ; (5-3)C	47.619 ; 18.182	>0.171833	N.S.
(5-2)C ; (5-3)C	39.286 ; 18.182	>0.225296	N.S.
(6-1)C ; (6-2)C	34.483 ; 45.588	>0.2170	N.S.
(6-1)C ; (6-3)C	34.483 ; 22.222	>0.532659	N.S.
(6-2)C ; (6-3)C	45.588 ; 22.222	>0.250842	N.S.
(4-1)F ; (4-1)C	35.413 ; 40.351	>0.308342	N.S.
(4-2)F ; (4-2)C	43.413 ; 31.119	0.002112	S.
(4-3)F ; (4-3)C	30.769 ; 16	>0.066853	N.S.
(5-1)F ; (5-1)C	50 ; 47.619	>0.558637	N.S.
(5-2)F ; (5-2)C	40 ; 39.286	>0.24522	N.S.
(5-3)F ; (5-3)C	57.443 ; 18.182	>0.207391	N.S.
(6-1)F ; (6-1)C	62.5 ; 34.483	>0.239568	N.S.
(6-2)F ; (6-2)C	52.174 ; 45.588	>0.328707	N.S.
(6-3)F ; (6-3)C	0 ; 22.222	>0.421053	N.S.

MORULA F,  
BLASTOCISTO  
TEMPRANO F, 41.096 ; 42.202 >0.16723 N.S.

MORULA F,  
BLASTOCISTO F, 41.096 ; 41.463 >0.262147 N.S.

BLASTOCISTO  
TEMPRANO F,  
BLASTOCISTO F, 42.202 ; 41.463 >0.293472 N.S.

CONTINUA . . .

COMPARACION	PROPORCION	2F	CONCLUSION
MORULA C; BLASTOCISTO TEMPRANO	30.534 ; 38.793	>0.107898	N.S.
MORULA C; BLASTOCISTO C	30.534 ; 40.566	>0.070600	N.S.
BLASTOCISTO TEMPRANO BLASTOCISTO C	38.793 ; 40.566	>0.2106	N.S.
MORULA; BLASTOCISTO TEMPRANO	36.101 ; 40.444	>0.127157	N.S.
MORULA; BLASTOCISTO	36.101 ; 40.816	<0.001895	S.
BLASTOCISTO TEMPRANO; BLASTOCISTO	40.444 ; 40.816	>0.171441	N.S.
TOTAL EMBRIONES F; TOTAL EMBRIONES C	41.326 ; 33.821	<0.008559	S.

F = FRESCOS

C = DESCONGELADOS--CONGELADOS

$\alpha = 0.05$

N.S. = NO SIGNIFICATIVA.

S. = SIGNIFICATIVA

(4-1) MORULA CALIDAD N.1 (5-1) BLASTOCISTO TEMPRANO CALIDAD N.1  
 (4-2) MORULA CALIDAD N.2 (5-2) BLASTOCISTO TEMPRANO CALIDAD N.2  
 (4-3) MORULA CALIDAD N.3 (5-3) BLASTOCISTO TEMPRANO CALIDAD N.3  
 (6-1) BLASTOCISTO CALIDAD N.1  
 (6-2) BLASTOCISTO CALIDAD N.2  
 (6-3) BLASTOCISTO CALIDAD N.3

LOS PORCENTAJES SON CORRESPONDIENTES AL ORDEN COMO SE MENCIONAN LAS COMPARACIONES .

LITERATURA CITADA

- 1.- Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones -  
LICONSA : Programa de actividades y técnicas a emplear,  
grupo de Recolección Embriones y Superovulación.  
Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones - LICONSA ,Tepotzotlán, Edo.de México, Junio 1986.
- 2.- Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones-  
LICONSA:Transferencia de Embriones.LICONSA,México,D.F.,1987
- 3.- Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones -  
LICONSA: Manual de Procedimientos, Grupo de Evaluación Embrionaria.Centro de Mejoramiento Genético y Transplante de Embriones - LICONSA , Tepotzotlán, Edo. de México, 1988.
- 4.- Daniel, W.W. : Biostatística, Base para el análisis de las Ciencias de la Salud.LIMUSA, México, D.F., 1982.
- 5.- Donaldson, L.E.: Matching of embryo stages and grades with recipient oestrus synchrony in bovine embryo transfer.Vet. Rec,19: 489 - 491 ( 1985 ).
- 6.- Dorn, C.G. and Kraemer, D.O. : Non - surgical bovine embryo collection procedure 1986,Department of Physiology and Pharmacology,College of Veterinary Medicine, Texas A & M University , College Station, Texas, 1986.

- 7.- Dorn, C.G. and Kraemer, D.C. : Bovine Embryo Grading 1987, Department of Physiology and Pharmacology, College of Veterinary Medicine Texas A & M University, College Station, Texas, 1987.
- 8.- Elsdon, R.P. and Seidel, G.E. Jr. : Procedures for recovery, bisection, freezing and transfer of bovine embryos. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, Jul. 1985.
- 9.- Elsdon, R.P. : Nonsurgical Recovery of Bovine Embryo Transfer 1986 Short Course Proceedings. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 34 - 37, Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO., 1986.
- 10.- Elsdon, R.P. : Transferring bovine embryos, Bovine Embryo Transfer 1986 Short Course Proceedings. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 50 - 52, Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO., 1986.
- 11.- Elsdon, R.P. : Transferring Bovine Embryos, Bovine Embryo Transfer 1986 Short Course Proceedings. Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO., 1986.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 12.- Elsdén, R.P. : Manual for embryo transfer. Peter Elsdén and Associates, Inc., Bellvue, CO. U.S.A., July 1987.
- 13.- Elsdén, R.P. : Mexican Government uses embryo transfer to increase production of National Dairy Herd. Theriogenology, 31: 47 - 48 ( 1989 ).
- 14.- Elsdén, R.P. and Associates Inc.: Protocol for freezing mammalian embryos in the RPE Freezer. Peter Elsdén & Associates Inc., Bellvue, CO., U.S.A., 1987.
- 15.- García, E. : Modificaciones al sistema de clasificación climatológica de Koopen. Facultad de Economía. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1981.
- 16.- Hammond, J. : Fertility in mammals and birds. Biological Reviews. 16 : 165 - 190 (1941).
- 17.- Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lathrop, W.F. and Foote, R.H.: Effect of donor - embryo - recipient interactions of pregnancy rate in large scale bovine embryo transfer program. Theriogenology, 27 : 139 - 168 ( 1987 ).
- 18.- Heyman, Y. : Factors affecting the survival of whole and half - embryos transferred in cattle. Theriogenology, 23 63-75 ( 1985 ).
- 19.- Hodges, L : Genetic improvement of livestock in developing countries using The Open Nucleus Breeding System. Regional Workshop on Biotechnology in Animal Production Health in Asia. FAO, 17-21. FAO, Bangkok, Thailand, Oct., 1988.

- 20.- Hunter, R.H.F. : Towards 100 % fertilisation in inseminated cows, with particular reference to the site of sperm storage. Animal Breeding Abstracts, 52 : 1-5 (1984).
- 21.- Hunter, R.H.F. : Reproduction of farm animals, Longman, Hong Kong, 1985.
- 22.- Leibo, S.P. : Commercial production of pregnancies from one - step diluted frozen - thawed bovine embryos. Theriogenology, 25 : 166 ( 1986 ).
- 23.- Liehman, P. and Fulka, J. : Pregnancy rate after synchronous and asynchronous transfer of frozen - thawed bovine embryos. Animal Reproduction Science, 11 : 181 - 186 ( 1986 ).
- 24.- Lindner, G.M. and Wright, R.W. Jr. : Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology, 20: 407 - 416 ( 1983 ).
- 25.- Marín, L.P. : La agroindustria y la comercialización de la leche en México. Memoria de la 4a. Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero. México 1988 pags. 49 - 72. B.N. Editores, México ( 1988 ).
- 26.- Navarro, F.R.R. : Análisis de Tablas de Contingencia 2 X 2. Aplicaciones en Medicina Veterinaria y Zootecnia. F.M.V.Z. - IIMAS, México, D.F. 1987.

- 27.- Newcomb, R. and Rowson, L.E.A. : Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. J. Reprod. Fert., 43 : 539 - 541 ( 1975 ).
- 28.- Pérez, D.M. : La ganadería lechera en México, Manual sobre Ganado Productor de Leche. Editado por : Marcelo Pérez Domínguez, 26 - 41, Ed. Diana, México, D.F., 1984.
- 29.- Rubalcava, C.E. Y Aguilar, V.A. : Principios y procedimientos en la producción agropecuaria. Administración Agropecuaria. Alfredo Aguilar V. y Col. 3ª. págs. 115-199, LIMUSA, México D.F., 1989
- 30.- Sánchez, A.P.A. : Selección y manejo de donadoras, Memorias del curso " Transferencia de Embriones ", Tepotzotlán, Edo. de México, 1988. págs. 27 - 32. LICONSA - UNAM, Tepotzotlán, Edo. de México ( 1988 ).
- 31.- Screenan, J.M. and Diskin, M.G. : Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. Theriogenology, 27 : 99 - 113 ( 1987 ).
- 32.- Shea, B.F. : Evaluating the bovine embryo. Theriogenology, 15: 31 - 42 ( 1981 ).
- 33.- Suarez, A.M., Guerra, D., Pérez, C.T. y De los Reyes, B.A. : Manual de genética animal II y III., Ediciones ENSPES, Ciudad de la Habana, 1982.

- 34.- Surgie, T., Seidel, G.E. Jr. y Hafez, E.S.E. : Transplante de embriones, Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Hafez, E.S.E. 4a. ed., 551 - 559. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F., 1987.
- 35.- Takeda, T., Hallowell, S.V., McCauley, A.D. and Hasler, J.F. : Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. Theriogenology, 25: 204 ( 1986 ).
- 36.- Wriht, M.J. : Non-surgical embryo transfer in cattle. Theriogenology, 15: 43 - 56 ( 1980 ).
- 37.- Zemjanis, R. : Reproducción Animal Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas. LIMUSA, México, 1987.