

2



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**COMPARACION DE DOS TECNICAS  
(ESTEREOSCOPICA Y ULTRAESTRUCTURAL)  
PARA LA EVALUACION DE EMBRIONES DE BOVINO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:**

**MONICA PATRICIA AGUILAR LOZANO**



**ASESORES:**

**M.S.C. CARLOS GALINA HIDALGO  
M.S.C. HORACIO MERCHANT LARIOS**

**MEXICO, D.F.**

2918 00 2001

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**PAGINACIÓN**

**DISCONTINUA**

## DEDICATORIAS

A Dios por haberme ayudado de una u otra forma en este camino.

A mi mamá por apoyarme en toda mi vida, tanto personal como sentimental, y darme su ejemplo.

A mi esposo Paulo por todo el amor que me ha dado.

A mi hijo Fer por ser ahora una parte muy importante en mi vida

A mi abuelo Pedro por el amor que siempre me dio.

A mi abuelita Blanca y a mi hermana Cecilia por todo su cariño.

Al Dr. Galina por todo lo que me enseñó durante toda mi carrera.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mama por su apoyo

A él Dr Galina por sus enseñanzas

Al Dr Merchant por toda la ayuda y por prestarnos su laboratorio y sus conocimientos

A Soledad Díaz, Isabel Marquez, Martin Maquivar, Claudia Sanchez y a Adriana Verduscopor ayudarme cuando no pude estar presente.

A todos los doctores que intervinieron en esta tesis que no se hubiera completado sin su ayuda

A la Facultad que me dio tantas oportunidades para poder aprender todo lo referente a mi carrera

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCIÓN . . . . .	2
HIPOTESIS . . . . .	12
OBJETIVOS . . . . .	12
MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	13
ANÁLISIS ESTADÍSTICO . . . . .	17
RESULTADOS . . . . .	18
DISCUSIÓN . . . . .	24
CONCLUSIONES . . . . .	27
LITERATURA CITADA . . . . .	28
CUADROS Y FIGURAS . . . . .	30

## RESUMEN

AGUILAR LOZANO, MÓNICA PATRICIA. Comparación de dos técnicas (estereoscópica y ultraestructural) para la evaluación de embriones de bovino (Bajo la dirección del: Dr. Carlos Galina y Dr. Horacio Merchant )

El aspecto de mayor importancia para el éxito de la Transferencia de embriones (TE), es la evaluación del grado de desarrollo embrionario, así como su calidad. Los métodos de observación por microscopio estereoscópico no siempre han sido efectivos en la predicción del porcentaje de fertilización obtenido, debido a que pueden encontrarse embriones que aún con características morfológicas buenas no siempre tienen una actividad metabólica normal, pudiendo tener defectos funcionales, que no son detectados al evaluarlos en fresco, pero si podrían ser detectados por medio de la microscopía electrónica. En este estudio se utilizaron 13 vacas, mayores de 6 años, que fueron tratadas con 2 implantes de 6 mg de Norgestomet durante 9 días , mas una inyección de 5 mg de Valerato de Estradiól y 3 mg de Norgestomet (Syncromate B, Rhone Merieux). Al séptimo y octavo se aplicaron 20 mg de Folltropin-V (Vetrepharm Canadá) por vía intramuscular dos veces al día, al noveno día 10 mg y al décimo 8 mg. En el noveno y décimo día también se aplicaron 25 mg (2ml) de Prostaglandina F2 alfa (Lutalyse/Upjhon). La detección de celos se hizo en forma continua, iniciándose a las 12 horas posteriores al retiro del implante, y las vacas se inseminaron 12 y 24 horas después del inicio del celo. La recolección embrionaria se realizó por medio de un lavado uterino, a los 7 y 8 días posteriores a la primera inseminación. Los datos se evaluaron por estadística descriptiva. En total se recuperaron 35 embriones, que se clasificaron primero por medio del microscopio estereoscópico, encontrándose un 45.7%(16) de embriones de buena calidad, 31.4%(11) de regulares y 22.8% de mala calidad. Después se colocaron en fijador de Karnovsky modificado para el examen de ultraestructura por medio de microscopía de luz, observándose un 28.5%(10) buenos, 48.5%(17) de regulares y 22.8%(8) malos. Finalmente, se realizaron cortes ultra finos para observarlos por microscopía electrónica con contraste de Uranilo al 25% y Citrato de Plomo al 0.3%, clasificándose en un 27.5%(9) como de buena calidad, 42.8%(15) regulares y 31.4%(11) mala calidad. En este estudio, se observó que la evaluación de embriones por medio de la microscopía de luz es subjetiva, ya que algunos embriones que se están calificando de calidad regular, y son excluidos de la transferencia, podrían tener capacidad de lograra una gestación y algunos embriones con una morfología externa buena, ultra estructuralmente ya se encuentran en etapa de degeneración.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial (IA) es una de las tecnologías que más ha contribuido al mejoramiento genético de la ganadería bovina; mediante este método se han obtenido hembras de alto valor al poder utilizarse el semen congelado de sementales con pruebas de progenie. Hasta hace pocos años, la IA sólo favorecía la optimización del genotipo proveniente de los sementales y la contribución de las hembras era muy escasa debido al reducido número de crías que podían producir por ciclo de vida, que en términos ideales sería una cría por año. (Molina, 2000)

De este modo, la tecnología de la transferencia de embriones (TE) se desarrolló con la finalidad de optimizar los recursos genéticos, tanto de los vientres como de los sementales. La primera TE exitosa se realizó en 1951 por Willet, quien colectó un embrión de 5 días de edad en el rastro, y lo transfirió quirúrgicamente a otra vaca a través de una incisión en la línea media del cuerno uterino (Betteridge, 1981). En la actualidad, la TE está mucho más avanzada y al utilizarse vacas de alta calidad consideradas como donadoras, se logra una producción masiva de embriones que se recuperan en etapas tempranas de desarrollo y se transfieren a otras vacas, consideradas receptoras, que tienen menor valor genético ya que su función es llevar a término la gestación. De esta forma las vacas "elite" puede producir un rango de 10 a 15 hijos por año, con lo cual el mejoramiento genético de los hatos ganaderos ha sido importante (Molina, 2000)

Uno de los principales obstáculos, que se ha observado para el uso generalizado de la transferencia de embriones, es el costo elevado, propiciando que su campo de aplicación se limite a aquellos animales cuyos hijos tendrán un valor económico elevado, de tal manera que puedan ser redituables los costos de la operación. Al respecto Madalena (1993) reportó que el costo para producir un embrión en los Estados Unidos es de 50 dólares aproximadamente y que el costo para producir un animal adulto procedente de transplante de embriones (manteniendo una eficiencia alta del proceso; 5 embriones transferibles por lavado, 50 % de supervivencia y mortalidad pos nacimiento inferior al 2 %) es de 350 dólares, valor

similar al costo de producción de animales convencionales. Sin embargo, no obstante que la tecnología de la transferencia embrionaria ha avanzado considerablemente en los últimos años, los resultados aún no son homogéneos y los índices de fertilidad no han sido tan satisfactorios como se esperaba, lo que ha impedido un mayor desarrollo de éstos programas.

A través de varios estudios, se ha observado una gran variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios, principalmente en el número de embriones transferibles recuperados. Así, Boland (1978), sugiere que para tener una menor cantidad de anomalías en los embriones (23.7% vs 10.6%), es necesario utilizar menos de 20 mg de  $17\beta$ -estradiól, en los tratamientos que incluyen esa hormona junto con PMSG. En otro estudio, Elsdén *et al.* (1978), encontraron que los animales tratados con 1800 UI de PMSG, aplicadas en un periodo de 3 días, tuvieron menos ovulaciones y un mayor número de embriones transferibles, así como de anormales, que los tratados con 36 mg de FSH-LH, en el mismo lapso de tiempo ( $p < 0.05$ ). Posteriormente, Goulding *et al.* (1991), compararon los tratamientos con FSH y PMSG, y obtuvieron  $12.3 \pm 0.81$  y  $8.1 \pm 0.60$  embriones, respectivamente ( $P = 0.0001$ ), concluyendo que el número de embriones recuperados es directamente proporcional al número de ovulaciones.

Otra causa que propicia diferencias, es la edad de los animales utilizados, como lo demuestran Mickelsen, *et al.* (1978), quienes observaron en animales prepúberes (4-7 meses de edad) tratados con PMSG, PMSG + LH, FSH y FSH + LH, obtuvieron un promedio de  $0.3 \pm 0.5$ ,  $5.6 \pm 11.0$ ,  $0.3 \pm 0.8$ , y  $3.6 \pm 4.1$  embriones colectados, siendo menor la recuperación a la obtenida con animales adultos, concluyendo que estas discrepancias se deben al hecho de que los animales prepúberes no poseen aún una madurez sexual, endocrina y anatómica en el momento del tratamiento.

Además, se han encontrado grandes diferencias en los índices de gestación obtenidos con los diferentes protocolos para la TE, un ejemplo es el experimento de Elsdén, *et al.* (1978) quienes encontraron más gestaciones con embriones de animales no tratados ( $p < 0.05$ ), que en los superovulados (71% y 59% respectivamente), y un índice mayor si los embriones eran de buena calidad (58%), a diferencia de los

regulares (31%) y malos (12%) ( $p < 0.05$ ). En otros protocolos como el de Reichenbach, et al. (1992) se encontró que al realizar TE bilateral se obtiene un mayor porcentaje de gestación a los 35 días y menos abortos ( $p < 0.05$ ) que colocando los embriones en sólo uno de los cuernos. Por otra parte, Schmidt et al., 1995, realizaron la maduración y fertilización in vitro de óvulos de bovino que después transfirieron a 22 hembras, obteniendo un 64% de gestaciones. Como puede notarse, las variaciones en los distintos protocolos son amplias, por lo que éstas disparidades han afectado de manera negativa la diseminación de la técnica a un mayor número de productores.

De igual forma, la combinación de las hormonas y la secuencia de los tratamientos afectan el número de embriones transferibles (Silva, et al. 1996). Esto sugiere, que no sólo el tratamiento es fundamental en los resultados, si no que también influyen los procesos fisiológicos que regulan el número de folículos que se desarrollan y finalmente ovulan, contribuyendo así a la variabilidad de la producción embrionaria después de una superovulación (Goulding, et al. 1996). Asimismo, en otro estudio se encontró que la superestimulación con cualquier tratamiento, causa alteraciones en la fisiología normal del animal, lo que ocasiona que entre el 15 al 20% de los donadores desarrollen embriones no transferibles (Greve, et al. 1995).

Según Barrios et al. (1982), la baja fertilidad de los embriones, cuando se usan los tratamientos anteriormente descritos, puede resumirse en 3 aspectos:

Factores extrínsecos desconocidos del embrión obtenido de un ambiente uterino anormal

Fallas en la fertilización

Factores intrínsecos del embrión, aún cuando haya sido obtenido de una vaca que anteriormente donó embriones que se desarrollaron a término.

Por otra parte, quizá el aspecto de mayor importancia para el éxito de la TE, es la evaluación del estado de desarrollo embrionario, así como su calidad (Linder, et al. 1983), ya que de este modo puede

evitarse el empleo de tiempo y la pérdida de dinero al transferirse embriones que no tienen oportunidad de generar una gestación.

Cuando se realiza la clasificación de los embriones, el objetivo es evaluar su calidad, y esto se logra mediante la observación de sus características morfológicas, siendo por lógica una manera subjetiva de hacerlo, por lo que el éxito dependerá de la experiencia del observador. Por lo tanto, no hay duda que la manera más eficiente de evaluar la viabilidad de los embriones, es considerar la tasa de gestación obtenida (Molina, 1999).

Durante el desarrollo embrionario, después de completarse la singamia, se inicia la segmentación del óvulo fecundado, éstas divisiones son sincrónicas durante los primeros días. Sin embargo, al avanzar el proceso se pierde ésta característica. El desarrollo embrionario y la diferenciación constan de varias etapas: compactación, formación del blastocele, expansión y maduración de la zona pelúcida. Así, Linder y Wright, et al. (1983) clasificaron a los embriones de acuerdo a su grado de desarrollo en (cuadro 2):

Se refiere a una agrupación o masa de células que tienden a ser esféricas, en la cual pueden observarse individualmente los blastómeros, la cuenta celular es difícil. La masa celular ocupa el 80% del espacio perivitelino.

Tiene como característica principal, una agrupación mayor de células que ocupan aproximadamente de 60 a 70 % del espacio perivitelino. En este estado, es poco probable contar con exactitud el número de blastómeros, y estos son de forma poligonal.

Es un embrión en fase de mórula compacta, en la que se empieza a formar una cavidad interna conocida como "blastocele". El blastocisto tiene apariencia de anillo y ocupa entre el 70 al 80 % del espacio perivitelino, pudiendo apreciarse visualmente una diferencia entre el trofoblasto y la masa celular. El blastocele abarca menos del 50% de la masa celular del embrión.

Se caracteriza por una diferenciación pronunciada entre las células del trofoblasto (que se extiende y alarga en toda la periferia del embrión) y el disco embrionario, que es una masa muy pequeña de color muy oscuro y más compacta. El blastocelo abarca más del 50 % del embrión y el embrión ocupa el 90 % del espacio previtelino.

Es un estado en el cual, hay un adelgazamiento de la zona pelúcida y un aumento apreciable del diámetro del embrión (hasta un tercio de su grosor normal), que ocupa el 100 % del espacio previtelino.

Tiene la zona pelúcida fisurada, por donde eclosiona paulatinamente hasta salir totalmente de ella. El embrión puede tener la forma esférica de un blastocisto expandido o bien estar colapsado.

Estos mismos autores, clasifican a los embriones de acuerdo a la calidad de las estructuras encontradas en:

**EXCELENTE:** Este es el embrión ideal. Esférico, simétrico, con células color ambarino y textura uniformes, sin blastómeros extruidos, pocas o ninguna vesículas, con pocos desechos celulares.

**BUENO:** Tiene pequeñas imperfecciones, como algunos blastómeros sueltos y/o extruidos, tamaño irregular o algunas vesículas. Este y los clasificados como excelentes se consideran de calidad 1.

**REGULAR:** Cuenta con problemas definidos, como son la presencia de blastómeros sueltos y/o extruidos, de color oscuro, vesiculaciones, algunas células degeneradas, desechos celulares. Masa pequeña pero no menor al 50% de lo normal. Se clasifican de calidad 2.

**MALO:** Embriones con problemas severos, como numerosos blastómeros sueltos y/o extruidos, células degeneradas, células de distinto tamaño, numerosas vesículas y zonas claras y oscuras. Se consideran de calidad 3.

**DEGENERADO:** Los blastómeros están desorganizados y sueltos. Células de apariencia vesicular, granular o crecimiento retardado en relación con el resto de los embriones obtenidos.

**NO FERTILIZADOS:** Pueden confundirse con mórulas compactas. Su apariencia es granular (puntillado), y se encuentran rodeados por una membrana vitelina lisa, que en el caso de estar rota, el puntillado cubrirá completamente el espacio vitelino.

Cuando se evalúa un embrión setenta y dos horas después del estro, puede observarse que ya tiene aproximadamente, 8 células, a los 5 días debe tener 32 células, difíciles de contar y es llamada mórula, a los 8 días se expande y un conjunto de células es empujado para uno de los lados, convirtiéndose en una masa celular, la línea que rodea al embrión es el trofoblasto y a los 9 días posteriores al estro el embrión emerge de la zona pelúcida y ya no es protegido por la capa de mucopolisacáridos. Una vez que esta eclosión ha ocurrido, la identificación de los embriones es más complicada (Shea, 1981).

El correcto desarrollo de estos pasos, así como el tiempo que tardan en suceder, son usados como indicadores de la salud y calidad embrionaria (Occhio, *et al.* 1999), esto se ejemplifica en el estudio de Shea (1981), en el que observó la presencia de embriones que a los 7 días posteriores a la fertilización siguen teniendo 8 células, pudiendo pensarse en tres posibilidades: el embrión está muerto, la ovulación se retrasó 3 ó 4 días, o que el desarrollo embrionario se encuentra severamente retrasado. Además que en este tipo de embriones hay una mayor probabilidad de encontrar gran cantidad de procesos degenerativos.

En un embrión bovino con un desarrollo normal, el diámetro calculado está entre 150 a 190 micras, incluyendo la zona pelúcida, la cual por sí sola, mide de 12 a 15 micras. El diámetro total del embrión

permanece constante desde su formación hasta que se expande y ecllosiona de la zona pelúcida (noveno día aproximadamente) (Lindner and Wright, 1983).

Por otra parte, se han observado que los embriones de calidad 1 son los mejores para congelarse, los de calidad 2, de igual manera pueden ser congelados, pero los resultados son pobres, sin embargo, existe la opción de transferirlos en fresco con un éxito aceptable. Finalmente, los de calidad 3, presentan índices de gestación bajos (Noriega, et al. 1995).

La clasificación de la calidad embrionaria, no siempre ha probado ser un método efectivo en la predicción de la fertilidad a obtener con los diferentes grupos de embriones, (Rondeau, et al. 1995), esto pudo probarse con el estudio de Merchant, y Chang, (1971), donde se encontró que algunos de los embriones que se clasificaron como buenos no produjeron gestaciones, hecho que los autores atribuyeron a un ambiente uterino anormal, ya que cuando algunos de éstos embriones se incubaron en úteros de ratón presentaron pocas anormalidades, sin embargo, al tratar de desarrollarlos fuera de ese ambiente no se consiguió que llegaran al mismo grado de madurez que un embrión incubado en el útero bovino. Más aún, Chartrain y Picard (1988), al evaluar el número de gestaciones de acuerdo a la calidad de los embriones, encontraron porcentajes del 31% en embriones considerados malos. Por estos reportes, la precisión en la evaluación de la calidad de los embriones antes de la transferencia, es un factor determinante para el éxito de los tratamientos (Rondeau, et al. 1995). Además, esto se refuerza si se consideran los resultados de un estudio realizado por Farin, (1995), en el cual varios observadores con experiencia, realizaron la evaluación de 40 embriones en diferentes estados de desarrollo y grados de degeneración, y estuvieron de acuerdo solo en el 68.5% de los diagnósticos, existiendo una mayor dificultad para poder diferenciar entre los embriones de buena y regular calidad. En otro estudio, Rondeau, et al., (1995), al estudiar el metabolismo de los embriones, encontraron que 47% de los de buena calidad no tenían una actividad metabólica normal, debido quizá, a defectos funcionales citoplásmicos o submicroscópicos que no pueden ser detectados en la evaluación morfológica

Por lo tanto, una forma para evaluar la calidad embrionaria de una manera más detallada, es por medio de la observación de las estructuras por la microscopía electrónica. Así, Mohr y Trounson (1981) describieron que los embriones normales de bovino con 5 días de edad, tienen en la membrana plasmática de los blastómeros microvellosidades abundantes, excepto donde éstos hacen contacto. Además, encontraron vesículas globulares de 1 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y que algunas contenían material lipídico o un material granular, estando delimitadas con una membrana. Las mitocondrias son electrodensas y presentan algunos cristales en la periferia, teniendo cerca abundante retículo endoplásmico liso, además, se observaron muchos ribosomas libres en todos los blastómeros, pero no se observó el retículo endoplásmico rugoso. El núcleo tenía varios nucléolos y presentaba poros a lo largo de la membrana nuclear.

De igual manera, Fléchon y Renard (1978) describieron que el embrión normal de bovino con 7 a 10 días de edad, tiene un diámetro de  $193.5 \pm 28.4 \mu\text{m}$ . La zona pelúcida es de aspecto rugoso y presenta blastómeros pequeños y redondos, que a veces pueden observarse separados por pequeños espacios intercelulares. En su interior, los núcleos son redondos con nucléolos grandes y el citoplasma es electrodenso con un citoesqueleto bien desarrollado (King, *et al.*; 1992). Otros investigadores, demostraron que las mitocondrias son abundantes, de formas redondeadas o alargadas, sin protuberancias, con crestas bien delineadas, y están asociadas a los retículos endoplasmáticos rugosos y lisos. Asimismo, encontraron que el aparato de Golgi es conspicuo, con abundantes poli-ribosomas intercalados en el retículo endoplásmico rugoso y que es normal encontrar vesículas lipídicas, que deben reducirse en número después del día 7 (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994). También se ha determinado que dentro de los blastómeros se encuentra un material granular fino, compuesto de ribosomas y polisomas, los que le dan una coloración oscura (Mohr y Trounson 1981; Shamsuddin y Rodríguez-Martínez 1994). Además, el trofoblasto tiene apariencia velluda, dada por las microvellosidades presentes en la cara externa de la membrana, y está formado por células epitelioides planas, pudiendo también observarse vesículas pinocíticas, que no son muy abundantes (Mohr y Trounson 1981; King, *et al.* 1992). Sus células están ancladas entre sí y a otros blastómeros por medio de complejos articulares (desmosomas y uniones apicales) (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994). A veces pueden encontrarse muchos microfilamentos asociados

a los desmosomas, que se extienden a lo largo de la unión entre las células de los trofoblastos, se cree que éstos filamentos, tienen una función estructural en la célula, dándole forma, rigidez y soporte (Mohr y Trounson, 1981).

Otro aspecto importante de considerar, es que al tratar de conservar los embriones se han encontrado diferentes anomalías, a pesar de que los embriones anteriormente hayan sido clasificados como excelentes. Esto pudo observarse en un estudio realizado por Hyttel *et al.* (1986), quienes encontraron que los embriones descongelados presentaban la zona pelúcida dañada y acumulaciones de desechos celulares en el espacio previtelino. así como defectos citoplasmáticos como la falta de límite de la membrana y espacios vacíos que van de 0.1 a 0.5  $\mu\text{m}$ . Asimismo, Shamsuddin y Rodríguez-Martínez (1994), encontraron que los embriones considerados de buena calidad y que posteriormente se cultivaron en medio libre de suero con insulina, transferrina y selenio (SFM) o en suero de vaca en estro con células epiteliales del oviducto bovino (BOEC), presentaban espacios entre las células de la masa interna, un menor desarrollo y número de desmosomas, teniendo una apariencia de unión incipiente entre blastómeros. Además, en varios estudios (Mohr y Trounson 1981; Chatrain y Picard 1988; Shamsuddin y Rodríguez-Martínez 1994) se observó que en embriones degenerados las microvellosidades eran más cortas y en menor cantidad que en los embriones normales, lo que se asocia con una menor capacidad para la captación de sustancias nutritivas necesarias para las células. También en el citoplasma de los blastocistos, se encontraron alteraciones como la presencia de muchos fagosomas y abundantes gotas lipídicas, así como degranulación del retículo endoplásmico y aumento del contenido lisosomal (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994)

En otros estudios, también se comparó la calidad morfológica a microscopía de luz, contra la metabólica de los embriones. Así, Rondeau *et al.* (1995), encontraron que los de buenas características morfológicas no siempre tienen una actividad metabólica normal (47% de los embriones clasificados como buenos), lo que se atribuyó a posibles defectos funcionales a nivel citoplasmático o submicroscópico que no son detectados por medio de la evaluación por microscopía de luz, pero sí por microscopía electrónica, siendo una causa probable de que éstos embriones no puedan desarrollarse normalmente, a pesar de ser

considerados de buena calidad en la evaluación con el microscopio estereoscópico. Si se considera que con el microscopio electrónico se tiene una visión de los organelos más clara y que de estos depende la función del embrión al hacer un análisis ultraestructural podremos saber si en el embrión han ocurrido cambios degenerativos a pesar de un diagnóstico favorable previo del embrión.

## **2. HIPÓTESIS**

Los embriones clasificados como de buena, regular y mala calidad por medio de microscopía estereoscópica, difiere con las evaluaciones realizadas por medio de microscopía de luz y/o microscopía electrónica

## **3. OBJETIVO**

Comparar la evaluación morfológica de los embriones por las técnicas de estereoscopia y microscopía electrónica.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase de campo del estudio, se realizó en un rancho particular localizado en el municipio de Pochotla, Estado de Veracruz. El clima de la zona se clasifica como caliente húmedo, sin una temporada de sequía definida, la precipitación pluvial es de 1780 mm anuales y la temperatura promedio de 21.8 °C, con rangos de 13 a 40 °C (García, 1981).

Se utilizaron trece vacas del genotipo Brahman x Suizo, mayores de 6 años con un peso promedio de 450 Kg, sin lactar y un rango en condición corporal de 2.5 a 4 puntos, medidos en la escala de clasificación del 1 al 5 para ganado de tipo Bos indicus, donde 1=delgada y 5=obesa (Pullan, 1978). Asimismo, las vacas se examinaron para verificar que se encontraran libres de alteraciones anatómicas o fisiológicas que pudieran afectar su fertilidad.

El tratamiento consistió en la aplicación subcutánea de dos implantes auriculares que contienen 6 mg de Norgestomet, mas una inyección de 5 mg de Valerato de Estradiól y 3 mg de Norgestomet, que se administran al momento de colocar el implante (Syncromate B/Rhone Merieux). Los implantes permanecieron colocados durante 9 días. Al séptimo y octavo día de colocados los implantes, se aplicaron 20 mg de Folltropin-V (Vetrepharm Canadá) por vía intramuscular dos veces al día, al noveno día 10 mg y al décimo 8 mg. Además, en los noveno y décimo días también se administraron 25 mg (2ml) de Prostaglandina F2 alfa (Lutalyse/Upjhon) (Cuadro 1). La detección de celos se hizo en forma continua, iniciándose a las 12 horas posteriores al retiro del implante, y el servicio por medio de inseminación artificial se realizó a las 12 y 24 horas después del inicio del celo (se consideró como inicio del celo el momento en que la vaca se deja montar).

La recolección embrionaria se realizó por medio de un lavado uterino, a los 7 y 8 días posteriores a la primera inseminación, para lo cual previamente se palpó a las vacas para estimar el número de los cuerpos lúteos existentes. Posteriormente, se lavó la región vulvar y se introdujo una sonda de Foley con camisa sanitaria y una guía de acero inoxidable para facilitar su paso por el cérvix y poder dirigirla hacia

uno de los cuernos uterinos. Una vez, que se tuvo la seguridad de que se estaba dentro del cuerno, se infló el globo de la sonda con solución salina fisiológica, para evitar que se moviera, se removió la gúfa y se conectó la sonda a una manguera Tygón, que a su vez, se insertó en una de sus salidas a un recipiente con PBS comercial, y la otra a un filtro Emm-com. A continuación, por gravedad y de forma gradual, se introdujo el PBS a los cuernos uterinos en cantidades de 50 a 100 ml, aplicando un masaje suave a los cuernos para facilitar la salida de los embriones y después se desalojó el líquido el cual tuvo que llegar al filtro Emm-com. Esta operación se realizó 3 ó 4 veces en cada cuerno uterino. Una vez terminado éste proceso, a cada animal se le aplicaron 25 mg (2ml) de prostaglandina F2 alfa (Lutalyse/Upjhon); y el filtro protegido de los rayos solares, se llevó a un lugar cerrado en donde se encontraba el material de laboratorio. Una vez allí, el líquido obtenido se depositó en cajas de Petri cuadriculadas, para facilitar la localización de los embriones por medio de un microscopio estereoscópico. Cuando se localizaba un embrión, se introducía una pipeta Pasteur para tomarlo y pasarlo a una caja de Petri de mantenimiento, en donde fueron evaluados por un técnico calificado y así, determinar su calidad clasificando a los embriones de acuerdo a los criterios de Linder et al., (1983), en:

- **Bueno.-** Embrión esférico con tamaño, color y textura uniformes, con la zona pelúcida integra, los blastómeros se encuentran sin defectos en su conformación, sin o con algunas vesículas. Tiene todas las características de un blastocisto maduro.
- **Regular.-** Tiene problemas definidos como son la presencia de blastómeros sueltos y/o extruidos, de color oscuro, vesiculaciones, algunas células degeneradas, desechos celulares. Masa pequeña pero no menor al 50% de lo normal. Puede tener daño en la zona pelúcida. Su desarrollo es menor a un blastocisto de 7 días.
- **Malos.-** Embriones con problemas severos, muchos o casi todos los blastómeros están estruidos, células degeneradas y/o de varios tamaños, numerosas vesículas de gran tamaño, sin embargo, se distingue la masa embrionaria y zonas claras y oscuras. Tiene daños en la zona pelúcida.

Una vez clasificados los embriones en cada una de las categorías, se colocaron en tubos de ensayo

que contenían Fijador de Karnovsky modificado en donde se mantuvieron por media hora, después se pasaron a otro tubo que contenía una sustancia buffer de Cacodilato de Sodio, y los tubos se sellaron con parfilm para ser transportados en refrigeración al laboratorio. Ya en el laboratorio, los embriones se colocaron en una solución de Tetróxido de Osmio al 1%, por 1 hora, después se lavaron 3 veces con agua destilada y se colocaron en alcohol en diluciones al 70%, 80%, 90%, 95% y 100%, permaneciendo por un lapso de 10 a 20 minutos en cada paso, para lograr su deshidratación. Después de este proceso, las muestras se colocaron en una solución de EPON hasta tener una dilución de 1:1, incubándose por una hora, más tarde se diluyó al 2:1 y nuevamente incubó por una hora. Finalmente, se mantuvieron en EPON puro durante 24 horas y se procedió a realizar cortes finos, estos se hicieron en forma seriada utilizándose el tercer corte para después teñirlo aplicando azul de metileno durante 30 segundos.

Posteriormente, cada muestra se observó por microscopía de luz, y cuando se encontraron entre 20 a 25 células con núcleo visible se dejó de cortar el embrión y se procedió a evaluarlos. Los criterios usados para la clasificación fueron los siguientes:

**Buenos.-** Embrión esférico con tamaño, color y textura uniformes, sin o con algunas vesículas. Zona pelúcida intacta, sin detritus celular en el espacio previtelino. Blastómeros con buena cohesión entre ellos, y núcleos definidos.

**Regulares.-** Forma irregular con daños pequeños en la zona pelúcida. Tiene algunos blastómeros estruidos, varias vesículas y algunas células degeneradas. Hay muchas vesículas lisosomales. Se encuentran algún detritus celular.

**Malos.-** Presencia de muchos o casi todos los blastómeros separados entre sí, con grandes cantidades de detritus celular en el espacio previtelino. Células de varios tamaños y/o degeneradas, numerosas vesículas de gran tamaño, aunque, es posible distinguir la masa embrionaria.

Después de concluir la anterior fase del estudio, se hicieron cortes ultra finos a los embriones y se les contrastó con Acetato de Uranilo al 2.5%, por 9 segundos, se lavaron con agua destilada y

posteriormente, también como medio de contraste, se colocaron en una gota de Citrato de plomo al 0.3%, durante 2 segundos. Las muestras ya preparadas, se observaron con un microscopio electrónico, en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y se evaluaron como:

**Buenos:** Blastómeros bien delimitados, núcleos con cromatina densa y bien localizada. Dentro de los blastómeros se presentan vesículas lipídicas no muy abundantes, mitocondrias de forma redonda y/o alargada, sin protuberancias, y con las crestas bien delimitadas. Además, se observan ribosomas y polirribosomas, como gránulos oscuros. Con un mayor aumento es posible observar el citoesqueleto distribuido en la parte interna del blastómero. Se puede observar claramente el aparato de Golgi. También hay vesículas lisosomales poco abundantes. En la cara de los blastómeros que se encuentra dirigida hacia el espacio previtelino se observan microvellosidades largas y abundantes y entre los blastómeros pueden verse las uniones celulares que son formadas por desmosomas.

**Regulares:** Blastómeros bien delimitados, núcleos con cromatina densa y mitocondrias de forma redonda y/o alargada. Hay vesículas lipídicas abundantes, así como lisosomales y a veces se puede ver que un blastómero esta fagocitando a otro. Existen espacios en donde no se observa ningún aparato celular y las uniones entre los blastómeros se encuentran en menor cantidad en comparación con los de buena calidad, dando la apariencia de estar separados. Las microvellosidades son más cortas y menos abundantes, si se comparan a los de un embrión normal.

**Malos:** Los blastómeros no están bien delimitados y se observa fagocitosis entre los blastómeros, llegando a desaparecer la membrana nuclear. Hay grandes cantidades de vesículas lipídicas y lisosomales, las mitocondrias no se observan bien definidas y casi no se aprecian las microvellosidades.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva, calculándose los porcentajes del número de embriones en las categorías de bueno, regular y malo, de acuerdo a la evaluación con microscopio estereoscópico (embriones en fresco), con microscopio de luz (embriones fijados) y con microscopio electrónico (embriones en cortes finos).

## **5.-RESULTADOS**

### **OBSERVACIONES DE CAMPO**

En respuesta al tratamiento aplicado, once de las vacas presentaron celo y posteriormente fueron inseminadas. En las dos restantes que no se detectaron en celo, se procedió a hacer un examen por palpación rectal y presentaron los ovarios estáticos, por lo que no se inseminaron y fueron eliminadas del estudio. En el momento de la recolección de los embriones, todas las vacas presentaron de 1 a 8 cuerpos lúteos en cada ovario. Sin embargo, en dos de ellas, no fue posible introducir la sonda de Foley por el cérvix y no se pudieron lavar los cuernos uterinos y realizar la recolección de embriones. En consecuencia en el estudio, únicamente se consideraron los embriones obtenidos de nueve animales.

### **EVALUACIÓN DE EMBRIONES POR MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO**

Se recolectaron en total 42 embriones, de estos el 47.6% fueron buenos, el 26.2% regulares y el 26.2% malos (cuadro 3), según los criterios de evaluación al microscopio estereoscópico, descritos anteriormente. En el momento de hacer ésta evaluación, 2 de los embriones se observaron, como blastocistos expandidos, debido a que fueron recolectados a los 8 días posteriores a la inseminación.

Sin embargo, al hacerse nuevamente el conteo en el laboratorio, se observó una pérdida de 7 (16.6%) de los embriones, debido posiblemente, a que se hayan quedado adheridos en las paredes de los tubos de ensayo o a las pipetas en el momento de la fijación, por lo que la distribución final de los embriones que se describe en el cuadro 4, fue de 45.7% (16) embriones de buena calidad, 31.4% (11) regulares y un 22.8% (8) de mala calidad.

## EVALUACIÓN DE EMBRIONES POR MICROSCOPIA DE LUZ

Una vez hechos los primeros cortes finos se realizó la observación por microscopía de luz, y se clasificó nuevamente en categorías, encontrándose un 28.5% (10) de embriones buenos, 48.5% (17) regulares y 22.8% (8) malos (cuadro 4).

En cuanto a las características morfológicas, en la figura 2 pueden verse los cortes finos de los embriones que fueron clasificados como malos, resaltando la presencia de blastómeros muy separados entre sí, y algunos con poca definición del núcleo. En la figura 3, que corresponde a este mismo grupo de embriones, se encontraron grandes espacios de color sólido (citoplasma), sin estructuras, y cercanas abundantes vesículas blancas que se pensó eran lisosomas dentro de los blastómeros. En la figura 4, se muestra un embrión de forma irregular en el cual se observan gránulos que son posibles detritus celulares por lo que no es posible distinguir a los blastómeros. No se observan grandes defectos en la zona pelúcida.

Las figuras 5 y 6 corresponden a embriones con calificación de regulares. Pudo notarse que presentaron espacios sin estructuras en los blastómeros, sin embargo, las vesículas blancas (lisosomas) no se apreciaron en cantidades tan grandes como en los embriones del grupo anterior. Los blastómeros se vieron bien definidos, con cohesión entre ellos y con núcleos bien formados.

Finalmente, los embriones de buena calidad, se ilustran en las figuras 7 y 8, se observaron embriones de forma redonda, con la zona pelúcida bien delimitada. Los blastómeros se encontraron bien definidos sin o con muy pocas vesículas blancas (lisosomas) dentro de ellos, pocos o ningún espacio que se observara sin estructuras. Era posible distinguir fácilmente a los núcleos dentro de los blastómeros.

## EVALUACIÓN DE EMBRIONES POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En cuanto a la evaluación por microscopía electrónica, se contaron un 27.5% (9) de embriones de buena calidad, 42.8% (15) regulares y 31.4% (11) con mala calidad (cuadro 4).

Las características ultraestructurales de los embriones que por éste método fueron clasificados como de buena calidad, se ejemplifican en las figuras 9 y 10. En la primera, se observaron blastómeros bien delimitados, los núcleos con cromatina densa y bien localizada, algunos tuvieron indicios de haber iniciado la división celular. Dentro de los blastómeros existieron vesículas lipídicas de forma circular, no muy abundantes, llegando a ser algunas muy oscuras, debido tal vez, a una fijación excesiva del osmio. Las mitocondrias eran de forma circular y/o alargadas, observándose cristales mitocondriales de diversas formas y longitudes, estas se ubican cerca del núcleo. En la cara externa de la membrana citoplasmática se observan abundantes microvellosidades. En la figura 10, se observan tres blastómeros bien definidos, núcleos con cromatina densa y bien localizada, algunos tuvieron indicios de haber iniciado la división celular, se observan abundantes mitocondrias y pocas vesículas lipídicas.

Las figuras 11, 12 y 13 corresponden también al grupo de buena calidad, pero con un estudio ultraestructural realizado con un mayor aumento. Así, en la figura 11 se observó que entre los blastómeros, pudieron observarse las uniones celulares que por lo general se forman por desmosomas, viéndose como dos placas electrodensas constituidas por filamentos citoplasmáticos delgados, el citoesqueleto bien desarrollado, teniendo la apariencia de filamentos finos que corren a todo lo ancho del blastómero. En el citoplasma los lisosomas se encontraron como vesículas de formas irregulares, con membranas limitrofes que en su interior contenían aglomeraciones de gránulos de diversas formas, que son detritus celular, son poco abundantes. También pudo visualizarse un puntillado oscuro que son los ribosomas y abundantes mitocondrias.

En la figura 12, se destacan las microvellosidades que se dirigen hacia el espacio previtelino, estas se observan como filamentos largos, delgados y abundantes, que cuando se cortan transversalmente, aparecen como pequeños anillos. En la figura 13, resaltan mitocondrias de diferentes formas, aquellas cuboidales pueden ser debido a que ellas también se dividen durante el ciclo celular. Estrechamente asociados a las mitocondrias se observan ribosomas y poli-ribosomas.

La figura 14, corresponde a uno de los embriones que se clasificó como regular, en esta imagen se observa un blastómero el cual posee en su citoplasma abundantes lisosomas y grandes inclusiones lipídicas lo que nos indica que ya es un fagosoma. Igualmente se observa el citoplasma de otro blastómero bien delimitados, los núcleos con cromatina densa bien localizada y grandes inclusiones lipídicas. En la figura 15, se observan blastómeros bien delimitados por sus membranas citoplasmáticas, núcleos con cromatina densa y bien localizada, con indicios de haber iniciado la división celular. En el citoplasma hay una mayor cantidad de lisosomas, así como vesículas lipídicas. En el embrión de la figura 16 se observa como el núcleo comienza a perder su membrana por acción de los lisosomas. La figura 17, muestra blastómeros bien definidos, aumentos de lisosomas y detritus celulares en el espacio previtelino. Puede observarse que se comienzan a perder las membranas celulares que dividen los blastómeros. La figura 18, muestra un núcleo bien definido, sin embargo se detecta un gran número de lisosomas.

En los embriones clasificados como de mala calidad, no existió una delimitación clara entre los blastómeros, ya que en muchas ocasiones perdieron sus membranas citoplasmáticas y se fusionan e con otros, teniendo la apariencia de un blastómero con dos núcleos, además, ya se encontraban rodeados por abundantes lisosomas. También, fue común observar la existencia de espacios en el citoplasma, que no tenían ningún organelo (figura 24) , y si se compara con la figura 9, que es un embrión de buena calidad, se observa una disminución en la cantidad y el tamaño de las microvellosidades, lo que se traduce en una mala absorción y por lo tanto en problemas para el transporte de nutrientes (Shamsudin y Rodriguez-Martinez, 1994). En algunas ocasiones se observó la cromatina bien localizada, pero sin la membrana nuclear que la protege (figura 21). Las vesículas lipídicas fueron de diversos tamaños, muy abundantes y casi siempre

asociadas con los lisosomas. La mitocondrias siguieron siendo de forma alargada o redonda, pero parecieron perder definición asemejando ser fagocitadas por los lisosomas. En muchas ocasiones se observaron fagosomas, esto se apreció al encontrarse adentro de un blastómero normal una membrana citoplasmática que delimitaba a otro blastómero, pero éste, ya no contaba con núcleo y sólo se vieron algunas mitocondrias, vesículas lipídicas y muchos lisosomas. Igualmente, se observó que las placas de los desmosomas se vieron menos densas y se encontraban en menores cantidades, además, pudo notarse que las microvellosidades, en algunos casos, desaparecieron casi por completo (figuras 19, 20, 22 y 23).

### COMPARACIONES ENTRE LAS OBSERVACIONES

En el cuadro 5, se muestran los porcentajes de los embriones en las diferentes categorías al evaluarse mediante los diferentes métodos, se aprecia que los embriones clasificados de buena calidad en el momento de la recolección, disminuyen ya que inicialmente son un 45.7% cuando se observan en fresco, y finalmente con microscopía electrónica sólo son un 25.7%. En el caso de los embriones regulares, en la evaluación en fresco se tuvieron 31.4% de las observaciones, aumentando a 48.5% con la observación en fijo, pero este porcentaje se reduce ligeramente con microscopía electrónica, a 42.8%. En los clasificados de mala calidad, en fresco y en fijo se observaron los mismos porcentajes (22.8%), pero con microscopía electrónica aumentan a 31.4%.

En los cuadros 6 y 7, también pueden apreciarse los movimientos en la clasificación de los embriones después de cada evaluación, siendo notorio que los cambios varían de observación a observación y de clasificación a clasificación pareciendo aleatorios, ya que no presentan un orden específico, puesto que no solo hay movimientos de embriones clasificados como buenos a regulares y de regulares a malos, si no que también pueden ser de malos a regulares a buenos. Este hecho se aprecia en el cuadro 8, donde puede observarse que hay un mayor número de embriones que se observan buenos en las observaciones en fresco y que cambian después a regulares con microscopía fija (70% del total de los embriones que cambiaron de clasificación). Asimismo en la microscopía de luz pasando a microscopía electrónica cambian más

embriones clasificados de regulares a malos (41.6% del total de los embriones que cambiaron de clasificación), pero aún así el número de embriones que cambian después de cada observación no son tan altos (28% y 34% respectivamente) en comparación con los que cambian de clasificación tomando en cuenta la evaluación por microscopía estereoscópica a microscopía de luz, que fueron un 48.5% del total. Así, un 35.2% de los embriones que fueron clasificados como buenos en la evaluación en fresco, al hacerlo por microscopía electrónica tuvieron calificación de regulares, y el 17.6% de embriones considerados como buenos en la observación en fresco se clasificaron como malos al evaluarlos por el microscopio electrónico.

## 6. DISCUSIÓN

El aspecto morfológico de los embriones que se clasificaron como de buena calidad, en la evaluación por microscopía electrónica, en el presente estudio, coincide con los de otros trabajos (Fléchon y Renard 1978; Hyttel, et al. 1986; Mohr y Trouson 1988; Chartrain y Picard 1988; King, et al. 1992), en donde las características más significativas para considerarlos de buena calidad fueron: blastómeros bien delimitados, con núcleos de cromatina densa y bien localizados, vesículas lipídicas no muy abundantes, mitocondrias de forma circular y/o alargadas, observándose bien los cristales mitocondriales, de diversas formas y longitudes, pueden encontrarse lisosomas, pero son poco abundantes. En la cara de los blastómeros que se dirige hacia el espacio previtelino se observan las microvellosidades largas, delgadas y abundantes. Se ven las uniones celulares, que son formadas en general, por desmosomas. Estas características hacen pensar que si pudieran ser transferidos lograrían con más facilidad una gestación.

En cuanto a los embriones clasificados como regulares, autores como Hyttel, et al. (1986), Chartrain y Picard (1988), Shamsudin y Rodríguez-Martínez (1994), los describen con blastómeros bien delimitados, con núcleos de cromatina densa, mitocondrias de forma redonda y/o alargada, vesículas lipídicas abundantes, así como lisosomales, por lo que empieza a notarse fagocitosis. Entre los blastómeros hay espacios donde no se observa ningún aparato celular y las uniones entre los blastómeros están en menor cantidad, dando la apariencia de estar separados. Las microvellosidades son más cortas y menos abundantes.

Los embriones que se clasificaron como de mala calidad presentaron como características específicas, blastómeros mal delimitados, fagocitosis muy evidente, llegando a desaparecer la membrana nuclear. Grandes cantidades de vesículas lipídicas y lisosomales, las mitocondrias no se observaron bien definidas y casi no se encontraron microvellosidades (Hyttel, et al. 1986; Chartrain y Picard 1988; Shamsudin y Rodríguez-Martínez, 1994).

Entre las observaciones en fresco y las evaluaciones de microscopía electrónica se encontraron algunas diferencias, sobre todo con respecto a los embriones de buena calidad, ya que con la primera había 16 embriones (45.7%) y en la segunda técnica solo 9 (25.7%) por lo que hay una diferencia del 56.2% y los de mala calidad teniendo en la observación en microscopía de luz 11 (31.4%) embriones y en la electrónica 15 (42.8%) lo que aumenta en un 26.6% la cantidad de embriones en esta clasificación (cuadro 8). Esto puede explicarse debido a la dificultad que implica una evaluación en fresco, ya que la resolución no permite distinguir muchas estructuras que podrían proporcionar una información valiosa, además, el veredicto depende totalmente de la experiencia del observador, convirtiéndose en algo subjetivo. Los resultados encontrados en este estudio, en cuanto a la observación de los embriones en fresco, concuerdan con el estudio realizado por Farin, et al. (1995), en el cual varios evaluadores que clasificaron embriones de buena calidad, sólo coincidieron en el 79.7% de los diagnósticos, en los de calidad regular un 66.3% y en los de mala calidad un 76%. Estando de acuerdo en un 100% de los casos de los embriones que estaban totalmente degenerados, concluyéndose que las diferencias encontradas fueron ocasionadas por los criterios de cada uno de los evaluadores.

En el presente estudio, también se encontró que algunos embriones, considerados malos por medio de la observación en fresco, se clasificaron como regulares por la microscopía electrónica, por lo que puede especularse que este tipo de embriones, son capaces de desarrollarse y llevar una gestación a término. También, existieron embriones clasificados como buenos en la evaluación en fresco, que posteriormente en la evaluación por microscopía electrónica se catalogaron como malos o regulares, por lo que cuando éste tipo de embriones se transfieren disminuyen notablemente sus oportunidades de gestar (cuadros 7 y 8); algo parecido encontraron Chartrain y Picard (1988), cuando evaluaron el número de gestaciones de acuerdo a la calidad de los embriones, reportando tasas de preñez de 31% en los embriones considerados malos, y el 37% de los embriones considerados como buenos no sobrevivieron. Estas mismas observaciones, fueron expuestas por Elsdén et al. (1978) quienes encontraron que los embriones calificados como malos por microscopía de luz, tuvieron un 12% de gestación cuando se transfirieron, lo que indica que a veces habrá embriones que a pesar de tener pocas probabilidades de producir una gestación, lo consiguen, y aquellos que

aparentemente tendrían todas las características para hacerlo no se desarrollan.

Aun así, a pesar de que la evaluación por medio de microscopio estereoscópico, en este estudio, fue subjetivo ya que depende exclusivamente de la habilidad del evaluador, la microscopía electrónica no puede sustituirla debido a que para hacer la observación del embrión es necesario cortarlo, por lo que se necesita de algún estudio concluyente para afirmar la hipótesis de que habrá diferencias entre las evaluaciones ya que se necesitaría de un estudio metabólico para afirmar esto.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se puede asumir que la evaluación de los embriones por medio de la microscopía estereoscópica, fue subjetiva, ya que muchos embriones que se están calificando de calidad regular podrían tener capacidad de lograra una gestación y son excluidos de la transferencia. También, que algunos embriones con una morfología externa buena, ultra estructuralmente ya se encuentran en etapa de degeneración.

La microscopía electrónica no puede ser concluyente para determinar el estado metabólico de los embriones, y por lo tanto para tener una evaluación más específica se requiere de una técnica para medir los parámetros metabólicos, lo que indicaría con exactitud si hay diferencias entre las evaluaciones.

La manera más precisa para evaluar la viabilidad del embrión, es por medio de los porcentajes de gestación, aunque estas comparaciones no son posibles debido a que la microscopía electrónica a pesar de que permite una mayor visualización necesita de fijar y cortar los embriones, siendo una técnica invasiva.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Barrios, D.R., Range, J.C., Harms, P.G., Blake, R.W., Kraemer, D.C. Evaluation of embryo collection and transfer as diagnostic tools for bovine infertility. Theriogenology. 1982; 17: 77
2. Betteridge, K.J., An historical look at embryo transfer. Journal of Reproduction and Fertility. 1981; 62: 1-13
3. Boland , M.P., Crosby, T.F., Gordon, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. Theriogenology. 1978; 10: 175-181
4. Chartrain, I., Picard, L., Ultrastructural Analysis of bovine embryos at days 6 to 8: Correlation with embryo quality. Theriogenology. 1988; 29:236
5. Donaldson, L.E. The efficacy of three superovulation regimens in cattle. Theriogenology. 1991;35: 195
6. Elsdon, R.P., Nelson, L.D., Seidel, G.E. Jr. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnat mare's serum gonadotrophin. Theriogenology. 1978;9:17-26.
7. Farin, P.W., Britt, J.H., Sahw, D.W., Slenning, B.D. Ageement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. Theriogenology. 1995; 44:339-349
8. Fléchon, J.E., Renard, J.P. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro. Journal of Reproduction and Fertility. 1978; 53: 9-12
9. Goulding, D., Williams, D.H., Roche, J.F., Boland, M.P. Super ovulation in heifers using either pregnant mare ´s serum gonadotropin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. Theriogenology. 1991;36:949-958.
10. Greve T., Callesen, H., Hyttel, P., Assey, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. Theriogenology. 1995; 43: 41-50
11. King, W.A., Shepherd, D.L., Plante, L., Powell, R., Looney, C.R., Barnes, F.L. An ultrastructural study of bovine embryos produced by nuclear transfer. Theriogenology. 1992; 37: 238
12. Linder, G.M., Wriqh, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology. 1983;29:407-416.
13. Madalena FE. A simple schema to utilize heterosis in tropical dairy cattle. WAR/RMZ. 1993, 75(1):17-25.
14. Merchant, H., Chang, M.C. An electron Microscopy Study of mouse eggs matured in vivo and in vitro. Anatomical Record. 1971; 171:31-38.
15. Mickelsen, W.D., Wriqh, R.W., Menino, A. R. Zamora, C.S., Paisley, L.G. Superovulation, fertilization, and embryo recovery in gonadotrophin treated prepubertal calves. Theriogenology. 1978; 10: 167-173
16. Mohr, L.R. and Trounson, A.O. Structural changes associated with freezing of bovine embryos.

Biology of reproduction. 1981; 25: 1009-1025

17. Molina, J; Efecto en la adición de somatotropina bovina al tratamiento de Folltropin V sobre la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en vacas cebuinas superovuladas en dos épocas del año en el trópico húmedo de Mexicano. (Tesis Maestría), México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM (2000)
18. Occhio, M.J.D., Jillella, D., and Lindsey, B.R. Factors that influence recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. Theriogenology. 1999;51:9-35.
19. Noriega, R; Martínez, S; Flores, R; Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos, 1ª ed; Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1995.
20. Reichenbach, H.D., Liebrich, J., Berg, U., Berm, G. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. Journal of Reproduction and Fertility. 1992; 95: 636-370
21. Rondeau, M., Guay, P., Goff, A.K., Cooke, G.M. Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. Theriogenology. 1995; 44:351-366.
22. Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J.F., Sulon, J., Hansen, H.B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology. 1995 :527-539
23. Shea, B.F. Evaluating the bovine embryo. Theriogenology. 1981; 15: 31-35
24. Silva A. P and Machado E. A. Eficacia de diferentes productos comerciais superovulatorios em programa de T,E em um rebanho Nelore/Nelore mocho. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. 1996: 24-216.
25. Shamusddin, M. y Rodriguez-Martinez, H., Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. Journal of Veterinary Medicine. 1994, 41: 307-316
26. Winnberger-Torres, S. y Fléchon, J.E. Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. Journal of Anatomy. 1974, 1:143-153

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

	Buenos	Regulares	Malos	Total de observaciones
Observación microscopía estereoscópica	16 (45.7%)	11 (31.4%)	8 (22.8%)	35
Observación microscopía de luz	10 (28.5%)	17 (48.5%)	8 (22.8%)	35
Observación microscopía electrónica	9 (25.7%)	15 (42.8%)	11 (31.4%)	35

**Cuadro 5.- Número embriones clasificados como buenos, regulares y malos en las evaluaciones por microscopía estereoscópica, microscopía de luz y microscopía electrónica**

	Observación Microsc. estereoscópica	Distribución de embriones	Observación Microsc. de luz	Distribución de embriones	Observación Microsc. Electrónica
<b>Buenos</b>	16	-7 +1	10	-3 +2	9
<b>Regulares</b>	11	-2 +8	17	-7 +5	15
<b>Malos</b>	8	-1 +1	8	-2 +5	11

**Cuadro 6. Distribución y cambios en la clasificación de embriones después de las evaluaciones por microscopía estereoscópica, microscopía de luz y microscopía electrónica**

9. CUADROS

FECHA	DIA	TRATAMIENTO
8-11-99	0	Dos implantes de progesterona e inyección de valerato de estradiól
15-11-99	7	Foltropin 2ml (20mg) dos veces al día
16-11-99	8	Foltropin 2ml (20mg) dos veces al día
17-11-99	9	Foltropin 1ml (10mg) dos veces al día Prostaglandina F2a (pm)
18-11-99	10	Foltropin 0.8ml (8mg) dos veces al día Prostaglandina F2a (am) retiro de implantes
19-12-99	11	Detección de vacas en celo IA 12 y 24 horas después de detectado el celo
20-12-99	12	Detección de vacas en celo IA 12 y 24 horas después de detectado el celo
25-12-99	17	Recolección embrionaria
26-12-99	18	Recolección embrionaria

**Cuadro 1. Tratamiento superovulatorio utilizado en los animales para realizar la recolección embriónica**

TIEMPO	NUMERO DE CELULAS
36-48 horas de iniciado el estro	2 células
Día 3	4 a 8 células
Día 4	8 a 16 células
Día 4 a 5	Mórula temprana (mayor a 16 células)
Día 5 a 6	Mórula madura (32 a 64 células)
Día 6 a 7	Blastocisto temprano (160 células)
Día 7 a 8	Blastocisto maduro (aprox. 200 células)
Día 8 a 9	Blastocisto en eclosión (mayor de 200 células)

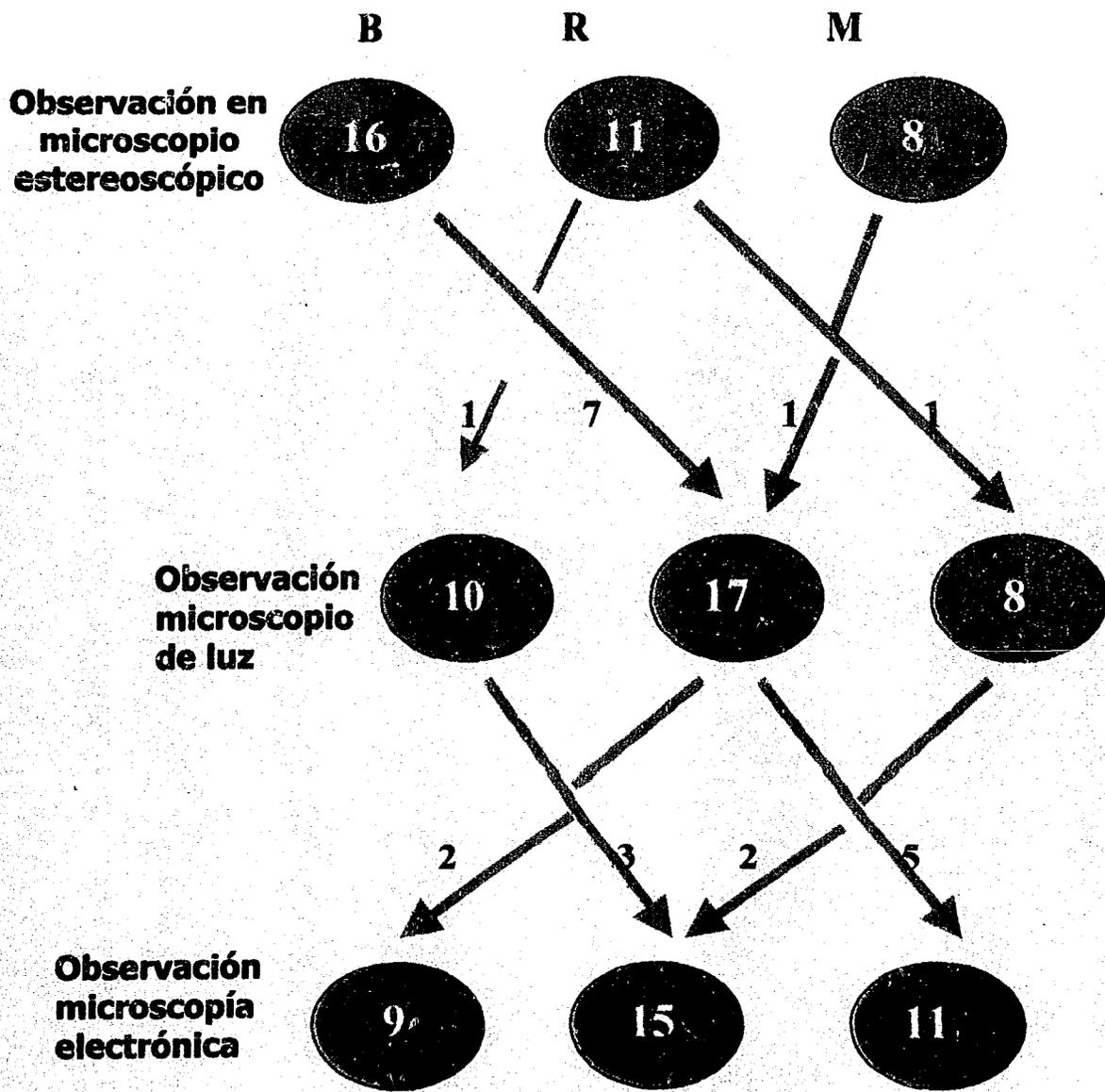
**Cuadro 2. Desarrollo de los embriones después de iniciado el estro según Lindner y Wright, 1983**

# VACA	Buenos	Regulares	Malos	Total
5	2	1	-	3
42	-	-	1	1
6	5	-	1	6
2	8	3	5	16
4	-	3	-	3
3	3	1	-	4
30	-	1	2	3
9	2	1	1	4
8	-	1	1	2
<b>TOTAL</b>	<b>20 (17.6%)</b>	<b>11 (9.2%)</b>	<b>11 (9.2%)</b>	<b>42 (100%)</b>

**Cuadro 3.-** Numero de embriones por vaca, recolectados y clasificados como buenos regulares y malos por microscopía estereoscópica al momento del lavado

VACA	Observación microscopía estereoscópica			Observación microscopía de luz			Observación Microscopía electrónica			Total
	Buenos	Regulares	Malos	Buenos	Regulares	Malos	Buenos	Regulares	Malos	
5	2	1	-	2	1	-	2	1	-	3
42	-	-	1	-	-	1	-	-	1	1
6	5	-	1	3	2	1	1	3	2	6
2	6	4	2	3	6	3	3	5	4	12
4	-	3	-	1	2	-	1	2	-	3
3	1	-	-	-	1	-	-	-	1	1
30	-	1	2	-	1	2	-	1	2	3
9	2	1	1	1	2	1	1	2	1	4
8	-	1	1	-	2	-	1	1	-	2
<b>TOTAL</b>	<b>16 (42.9%)</b>	<b>11 (31.4%)</b>	<b>3 (22.8%)</b>	<b>10 (28.5%)</b>	<b>17 (48.5%)</b>	<b>8 (22.8%)</b>	<b>9 (25.7%)</b>	<b>15 (42.8%)</b>	<b>11 (31.4%)</b>	<b>35 (100%)</b>

**Cuadro 4.** Evaluación de los embriones por vaca, en buenos regulares y malos, después de las evaluaciones en fresco por microscopía estereoscópica, microscopía de luz, y por microscopía electrónica



**Cuadro 7. Cambios en las clasificaciones de buenos regulares y malos, al ir pasando de las observaciones de microscopía estereoscópica, microscopía de luz, microscopía electrónica**  
**B= Buenos R= Regulares M= Malos**

Observación microscopía estereoscópica	Observación microscopía de luz	Número embriones
Buenos	Regulares	7 70%
Regulares	Malos	1 10%
Regulares	Buenos	1 10%
Malos	Regulares	1 10%
Buenos	Malos	0 0%
		<b>10 28%*</b>

Observación microscopía de luz	Observación microscopía electrónica	Número embriones
Buenos	Regulares	3 25.0%
Regulares	Malos	5 41.6%
Regulares	Buenos	2 16.6%
Malos	Regulares	2 16.6%
Buenos	Malos	0 0%
		<b>12 34%*</b>

Observación microscopía estereoscópica	Observación microscopía electrónica	Número embriones
Buenos	Regulares	6 32.2%
Regulares	Malos	3 17.6%
Regulares	Buenos	2 11.7%
Malos	Regulares	3 17.6%
Buenos	Malos	3 17.6%
		<b>17 48.5%*</b>

**Cuadro 8. Movimiento y porcentaje de los embriones que cambiaron de clasificación después de cada observación**

\*Porcentaje que tuvo cambios en la clasificación tomando en cuenta el total de los 35 embriones

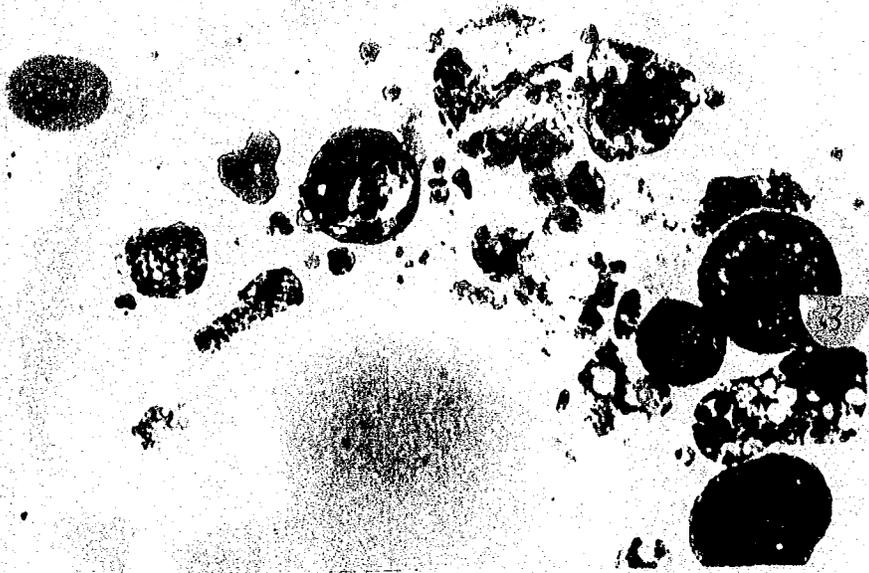
**FIGURA 1**

**7d397(9B, 40X)**= Se observan blastómeros con grandes cantidades de vesículas  
bancas (liosomas).

**Zp= Zona pelúcida B= Blastómeros L= Lisosomas**



**FIGURA 2**  
8d400 (2R, 60x) = Blastómeros separados entre sí, con muchos detritus celulares.  
Zp= Zona Pelúcida B= Blastómeros

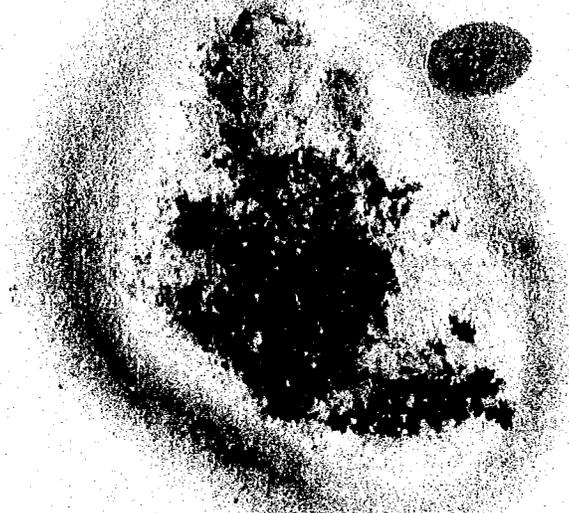


**FIGURA 3**

**6d397 (3M, 40x sin filtro) =** Se observan los blastómeros con espacios de color sólido (citoplasma) sin estructuras visibles. También se distinguen dentro de estos vesículas pequeñas y blancas (lisosomas) en gran cantidad  
**Zp= Zona Pelúcida B= Blastómeros L= Lisosomas**

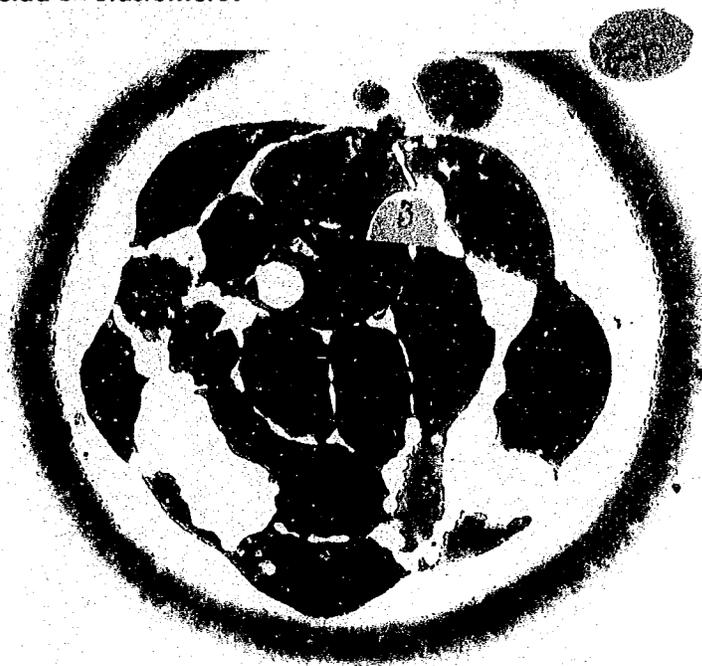


**FIGURA 4**  
**216400 (2m, 40x con filtro)**= El embrión tiene una forma irregular, dentro se observan abundantes gránulos que son posibles detritus celulares. No se distinguen los blastómeros.  
**Zp= Zona Pelúcida**



**FIGURA 5**

**3d397(3R, 40x sin filtro)**= En los blastómeros se observan zonas de color sólido (citoplasma) sin estructuras aparentes, aún así los blastómeros están definidos  
**Zp= Zona pelúcida B= Blastómeros**



**FIGURA 6**

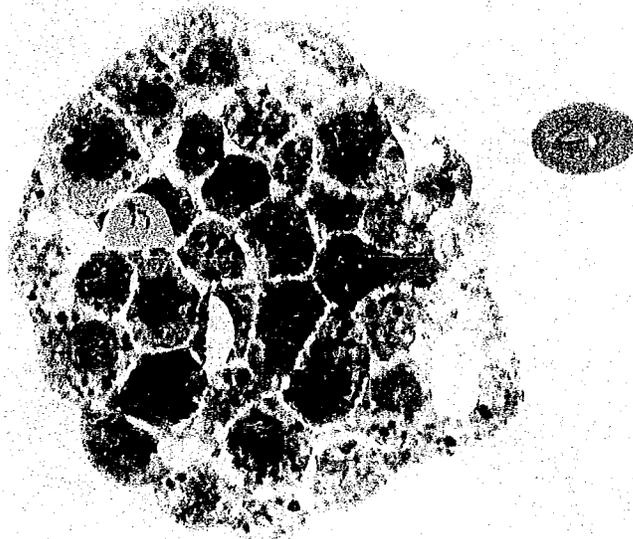
**4d397 (9M, 40x con filtro)**= Se observan algunos detritus celulares en el espacio previtelino y dentro de los blastómeros se distinguen pequeñas vesículas blancas (lisosomas), sobre todo alrededor de los núcleos.  
**Zp= Zona Pelúcida B= Blastómeros L= Lisosomas**



**FIGURA 7**

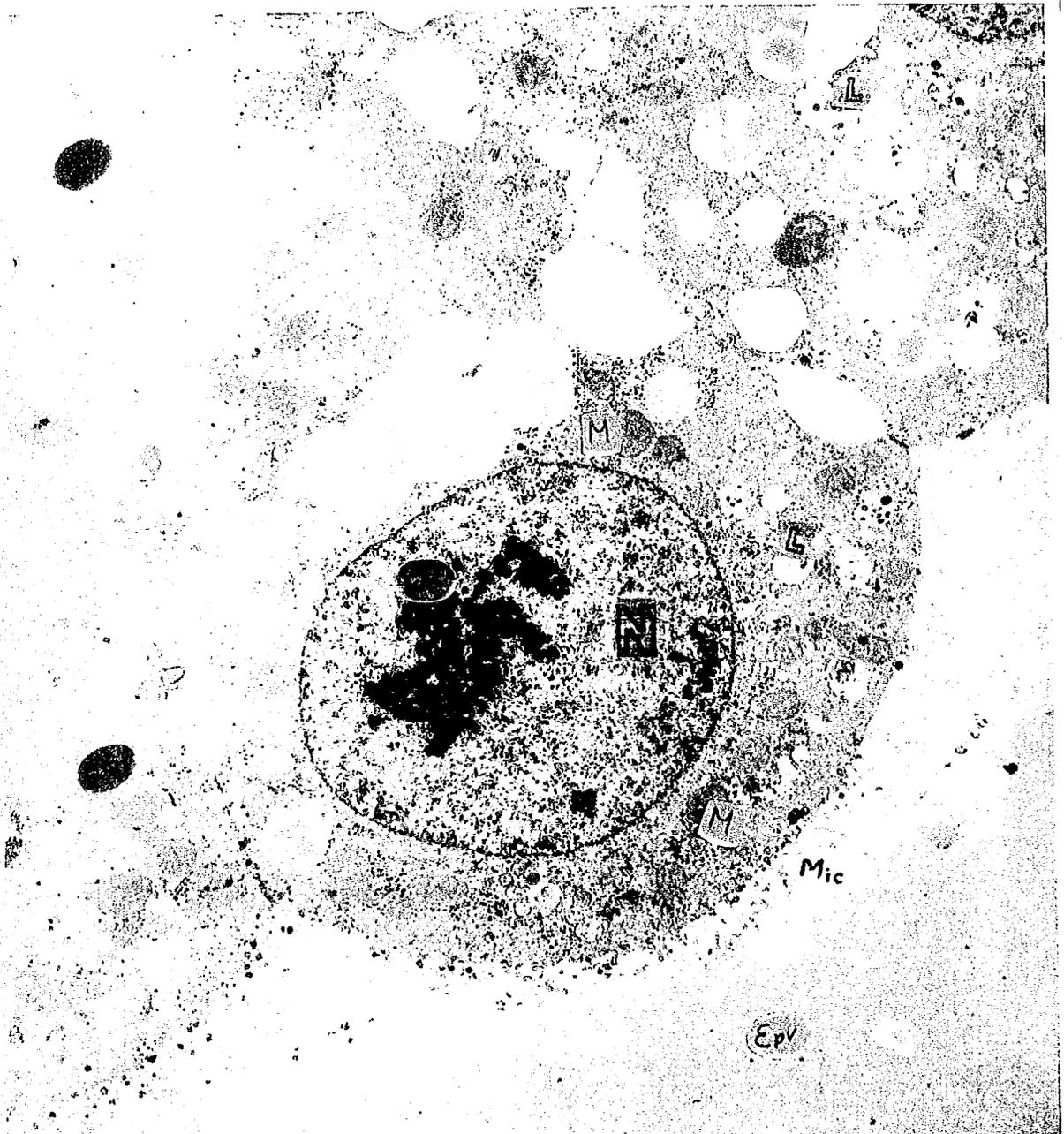
**8d397 (9B, 40x con filtro)** = Los blastómeros se observan bien definidos y se distinguen los núcleos de casi todos.

**Zp= Zona Pelúcida B= Blastómeros**

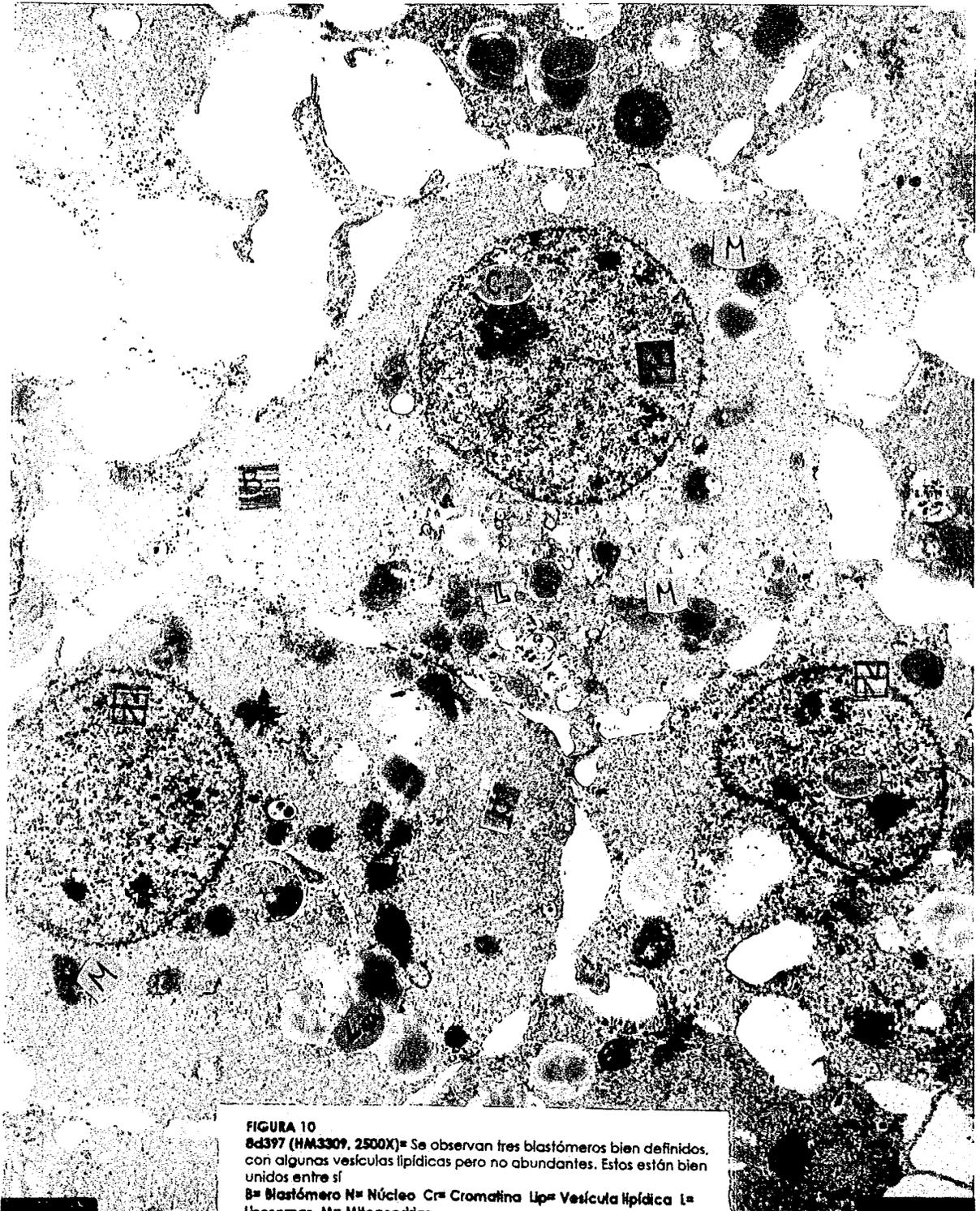


**FIGURA 8**  
**5d397 (8R, 40x con filtro) =** Los blastómeros se observan bien definidos y se distinguen los núcleos de casi todos.  
**Zp= Zona Pelúcida B= Blastómeros**

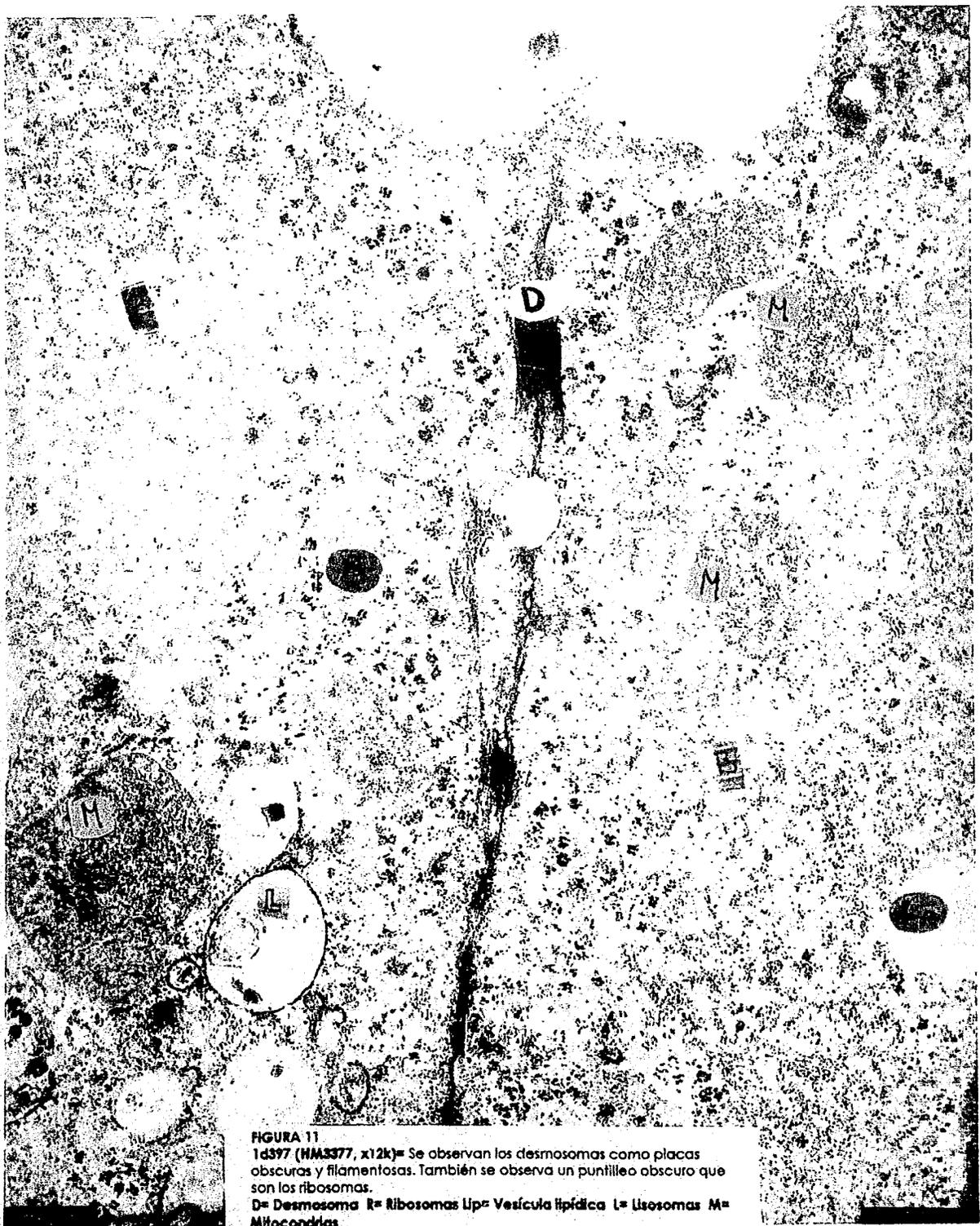




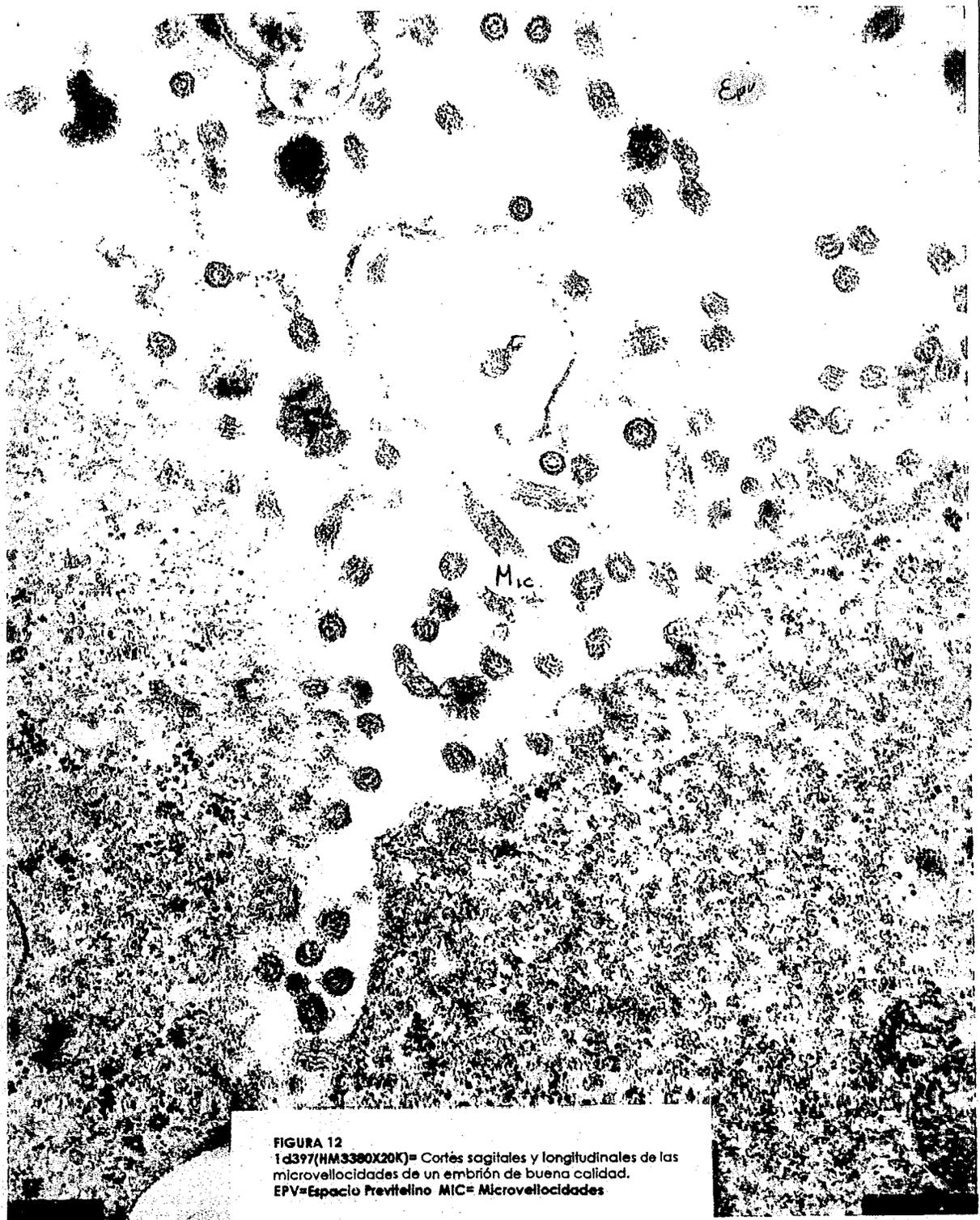
**FIGURA 9**  
8d397 (HM3307, 2500X) = Los blastómeros están bien delimitados, sus núcleos tienen la cromatina densa y bien localizada. Se pueden observar las mitocondrias de forma circular cerca del núcleo. Se observan vesículas lipídicas y alguno que otro lisosoma. Las microvellosidades son abundantes.  
EPV = Espacio Perinuclear MIC = Microvellosidades N = Núcleo Cr = Cromatina Up = Vesícula lipídica L = Lisosomas M = Mitocondrias



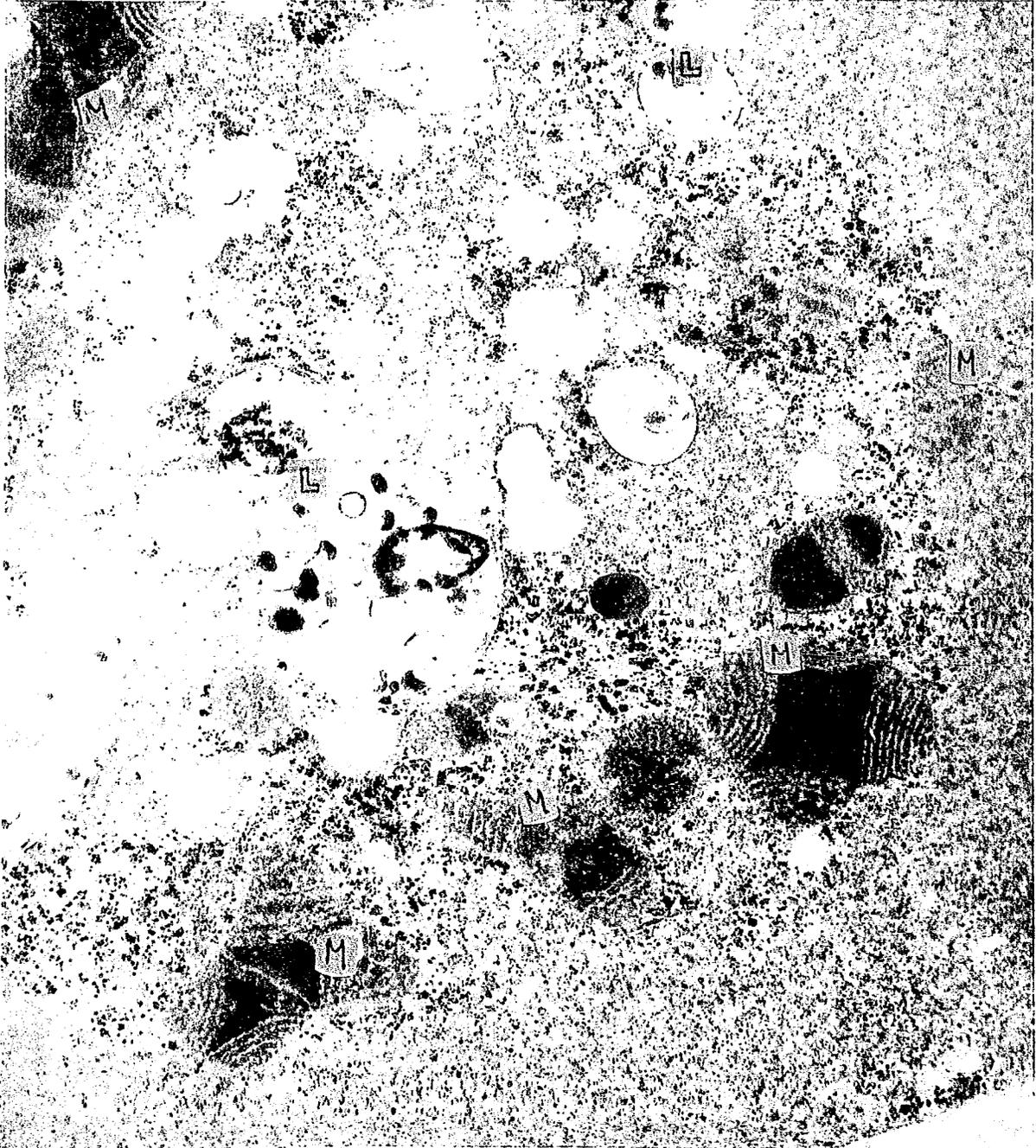
**FIGURA 10**  
8d397 (HM3309, 2500X) Se observan tres blastómeros bien definidos, con algunas vesículas lipídicas pero no abundantes. Estos están bien unidos entre sí  
B= Blastómero N= Núcleo Cr= Cromatina Lip= Vesícula lipídica L= Lisosomas M= Mitochondria



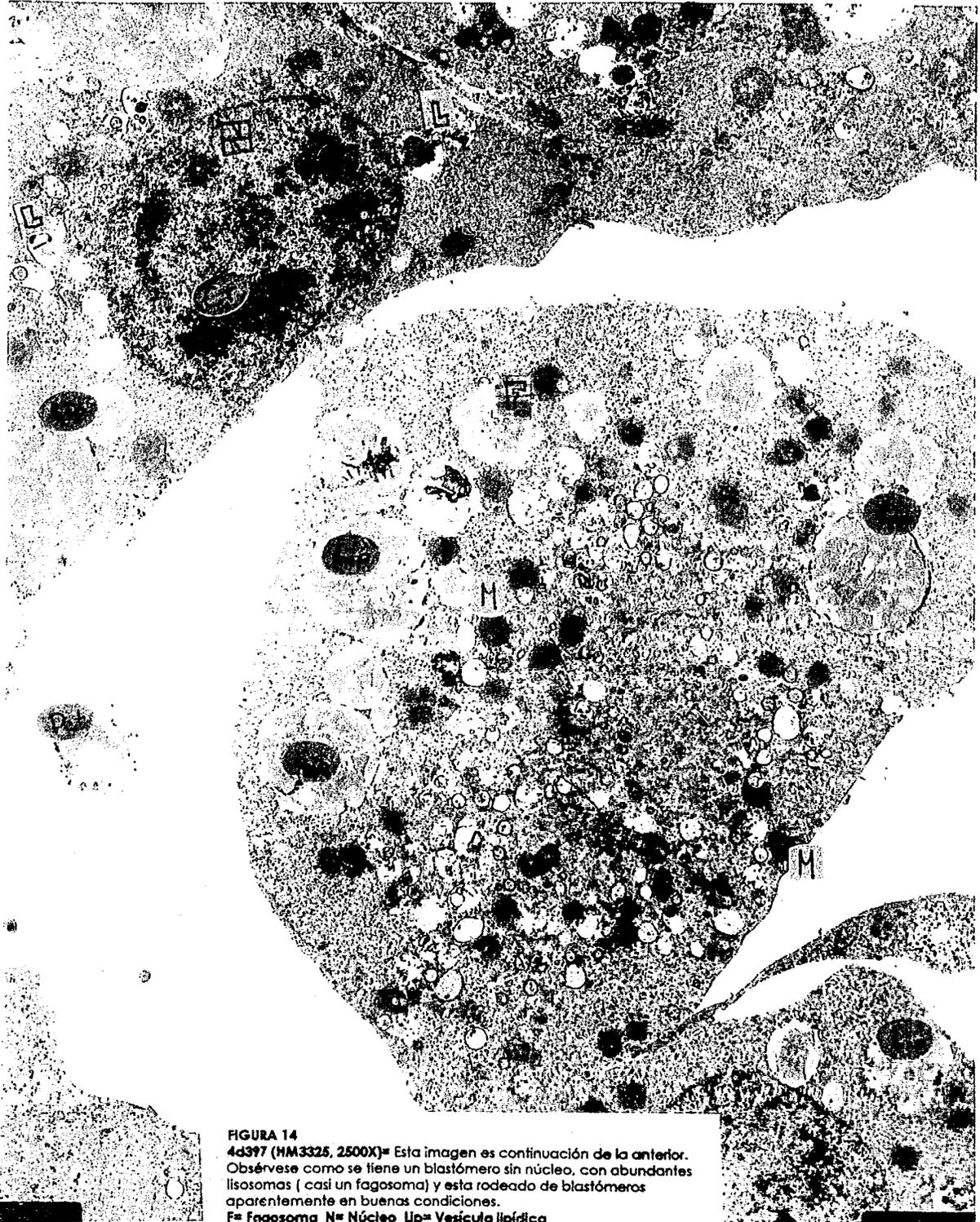
**FIGURA 11**  
1d397 (HA3377, x12k) = Se observan los desmosomas como placas  
oscuras y filamentosas. También se observa un puntillero oscuro que  
son los ribosomas.  
D= Desmosoma R= Ribosomas Lip= Vesícula lipídica L= Lisosomas M=  
Mitochondrias



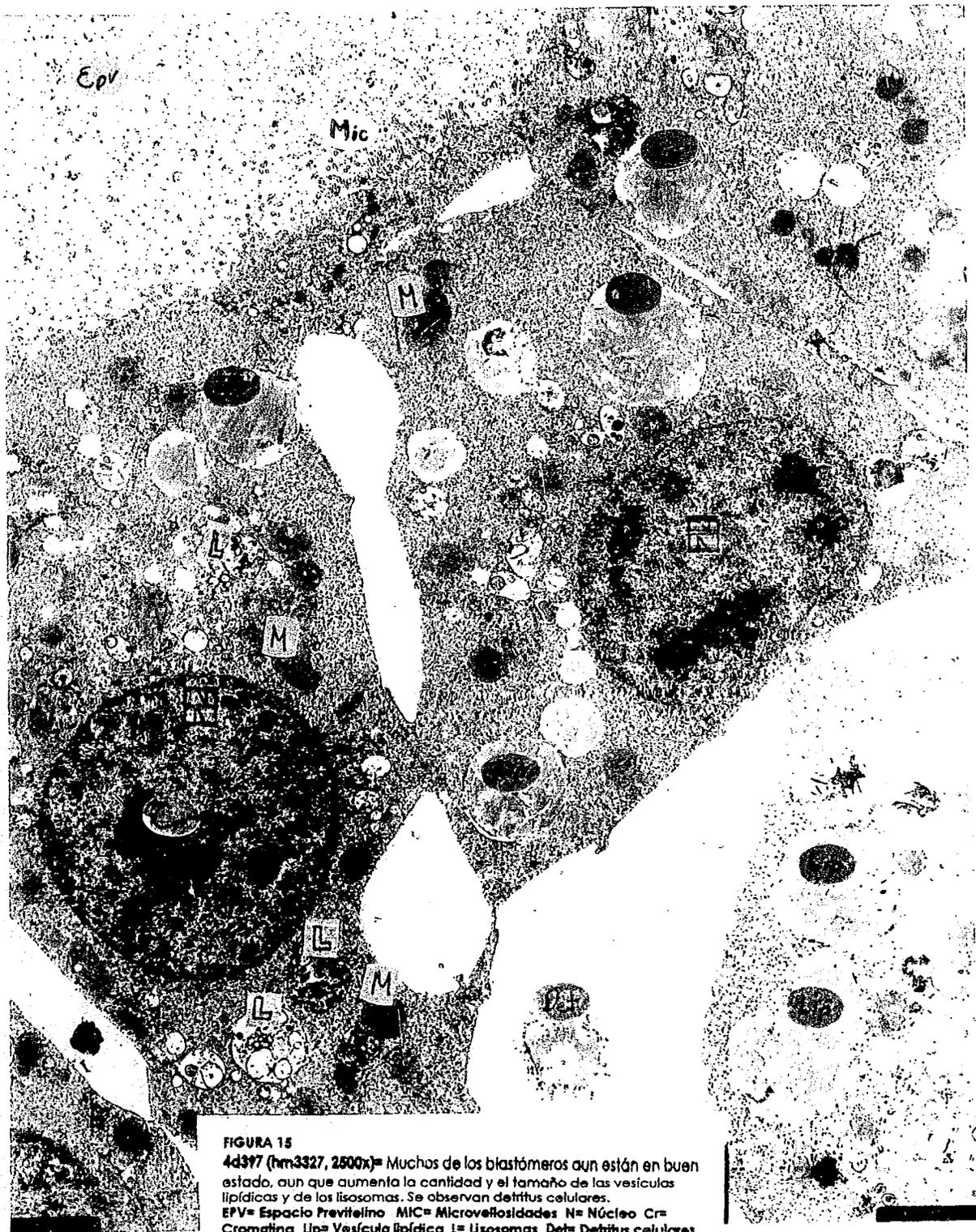
**FIGURA 12**  
1d397(HM3390X20K)= Cortes sagitales y longitudinales de las  
microvellocidades de un embrión de buena calidad.  
EPV=Espacio Previtelino MIC= Microvellocidades



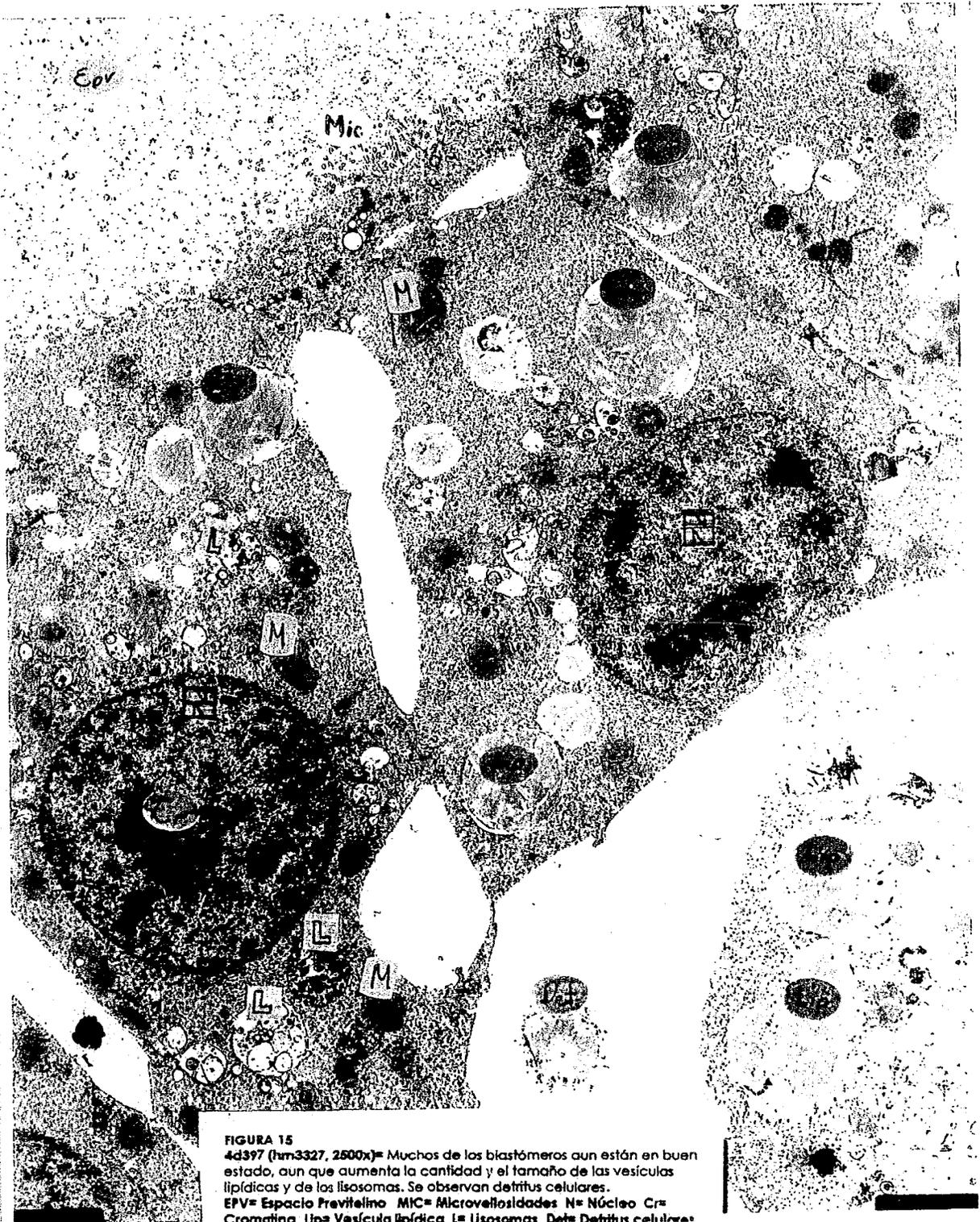
**FIGURA 13**  
**1d397 (HM3377, x12k)**= Diferentes formas de mitocondrias, aquellas de forma cuboidal pueden ser debido a que ellas también se dividen al momento en que una célula se esta reproduciendo. Estrechamente asociados se pueden observar los ribosomas o poiñ ribosomas  
**M= Mitocondrias R= Ribosomas L= Lisosomas**



**FIGURA 14**  
4d397 (HM3325, 2500X) = Esta imagen es continuación de la anterior.  
Obsérvese como se tiene un blastómero sin núcleo, con abundantes  
lisosomas ( casi un fagosoma) y esta rodeado de blastómeros  
aparentemente en buenas condiciones.  
F= Fagosoma N= Núcleo Lip= Vesícula lipídica



**FIGURA 15**  
**4d397 (hm3327, 2500x)** = Muchos de los blastómeros aun están en buen estado, aun que aumenta la cantidad y el tamaño de las vesículas lipídicas y de los lisosomas. Se observan detritus celulares.  
 EPV= Espacio Previtelino MIC= Microvelosidades N= Núcleo Cr= Cromatina L= Vesícula lipídica L= Lisosomas Det= Detritus celulares



**FIGURA 15**  
4d397 (hm3327, 2500x) = Muchos de los blastómeros aun están en buen estado, aun que aumenta la cantidad y el tamaño de las vesículas lipídicas y de los lisosomas. Se observan detritus celulares.  
EPV = Espacio Previtelino MIC = Microvelosidades N = Núcleo C = Cromatina Lip = Vesícula lipídica L = Lisosomas Det = Detritus celulares

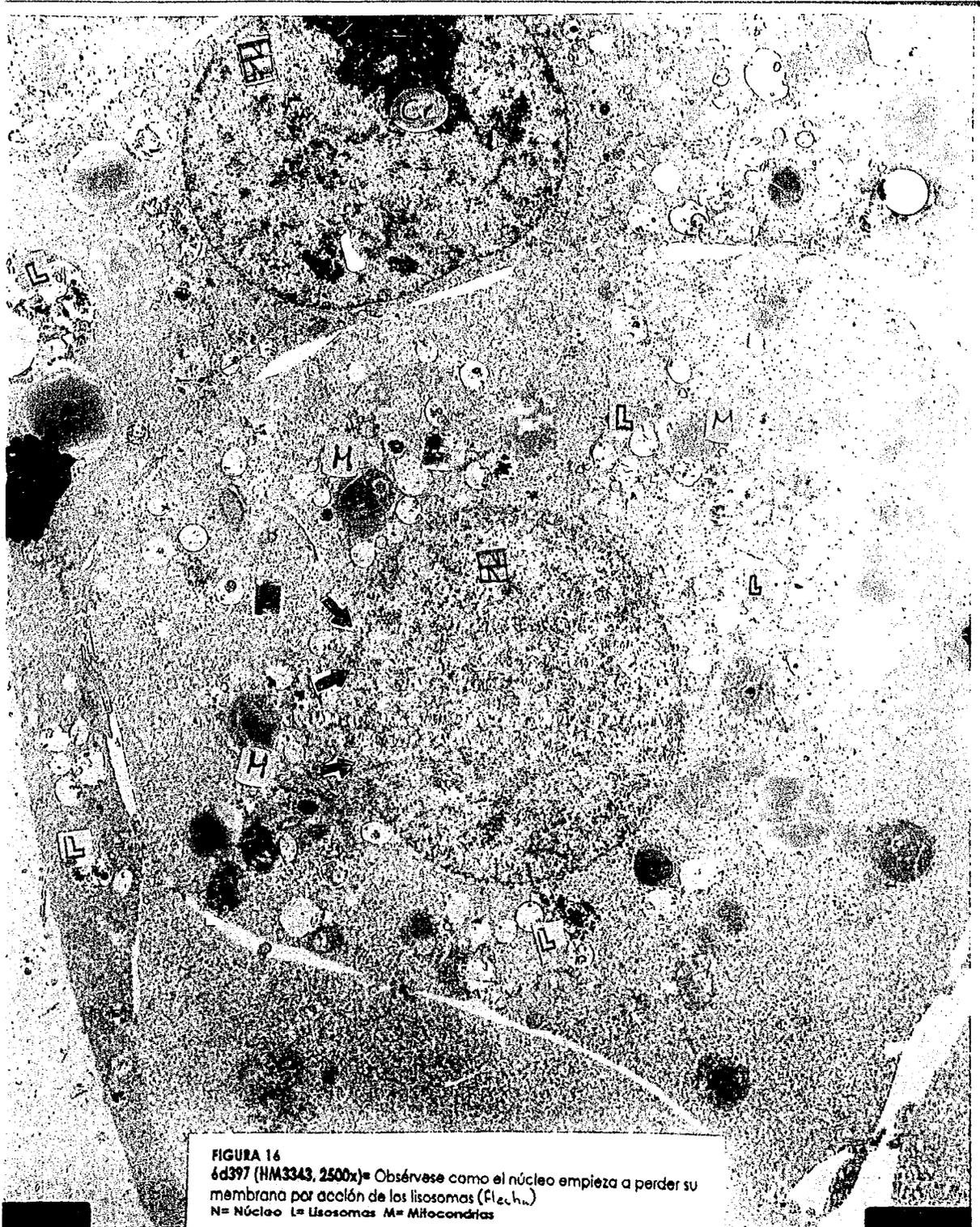
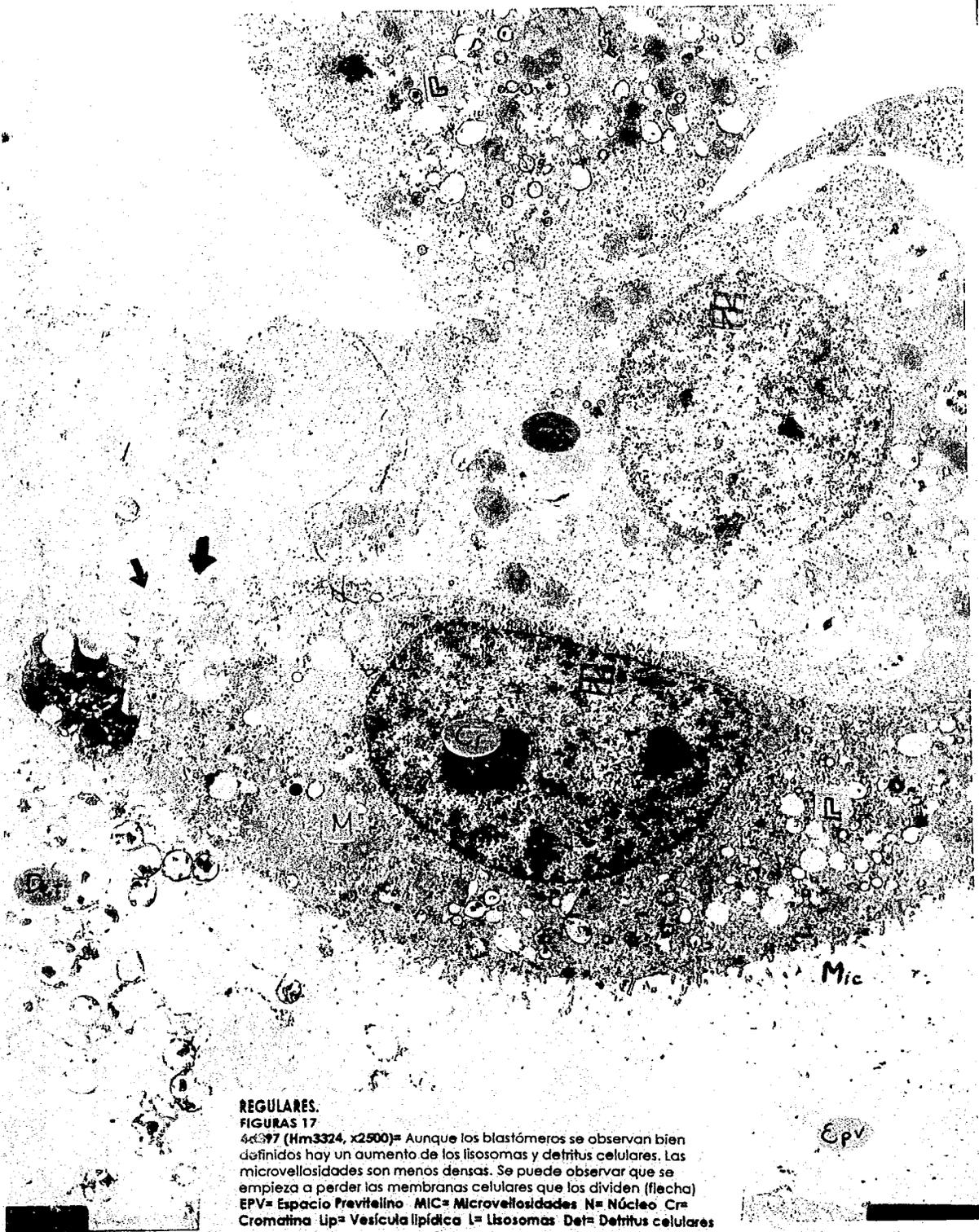


FIGURA 16  
6d397 (HM3343, 2500x) = Obsérvese como el núcleo empieza a perder su  
membrana por acción de los lisosomas (Flechas)  
N= Núcleo L= Lisosomas M= Mitochondrias



**REGULARES.**

**FIGURAS 17**

4x197 (Hm3324, x2500) = Aunque los blastómeros se observan bien definidos hay un aumento de los lisosomas y detritus celulares. Las microvellosidades son menos densas. Se puede observar que se empieza a perder las membranas celulares que los dividen (flecha)  
 EPV = Espacio Previtelino MIC = Microvellosidades N = Núcleo Cr = Cromatina Lip = Vesícula lipídica L = Lisosomas Det = Detritus celulares

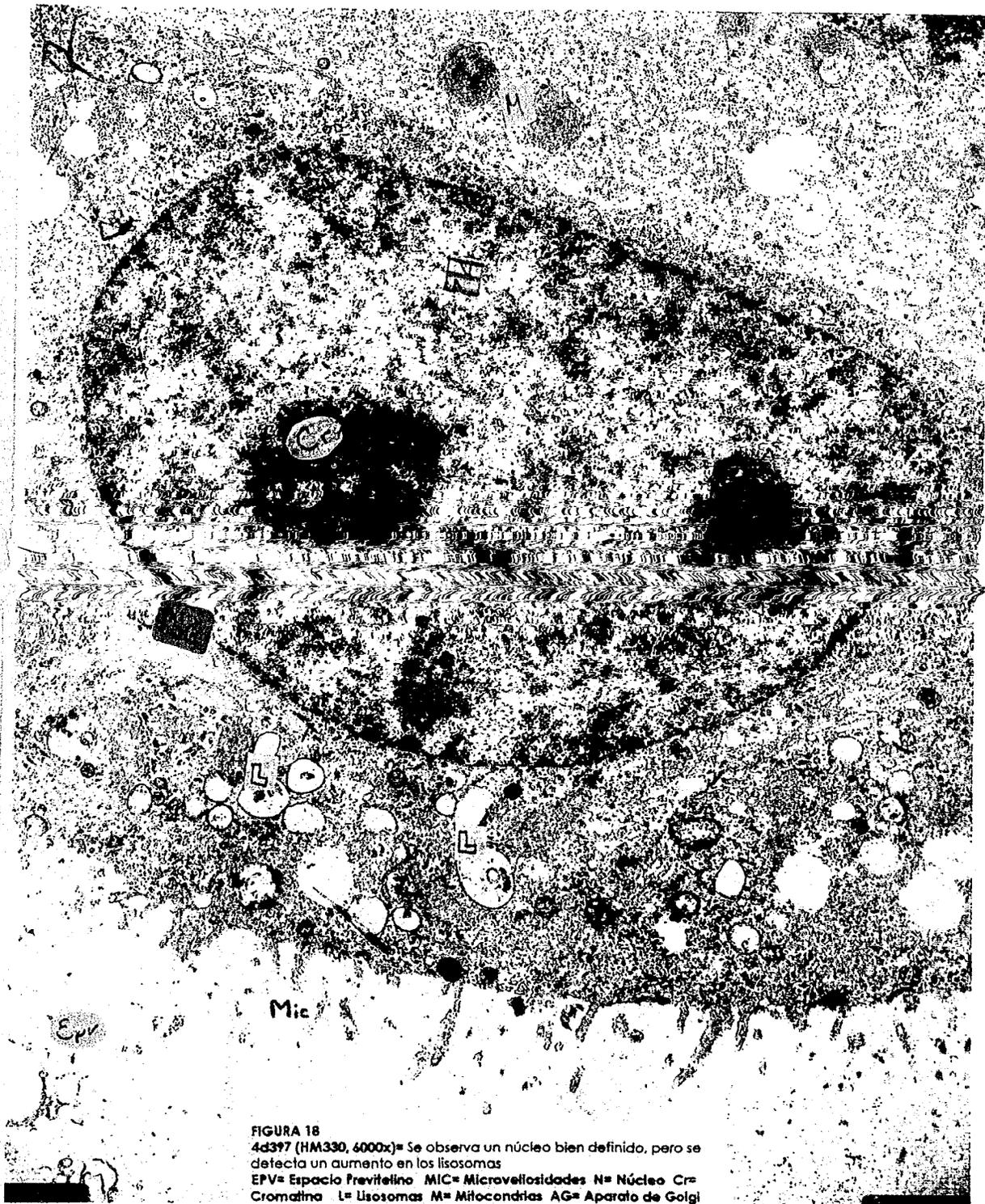
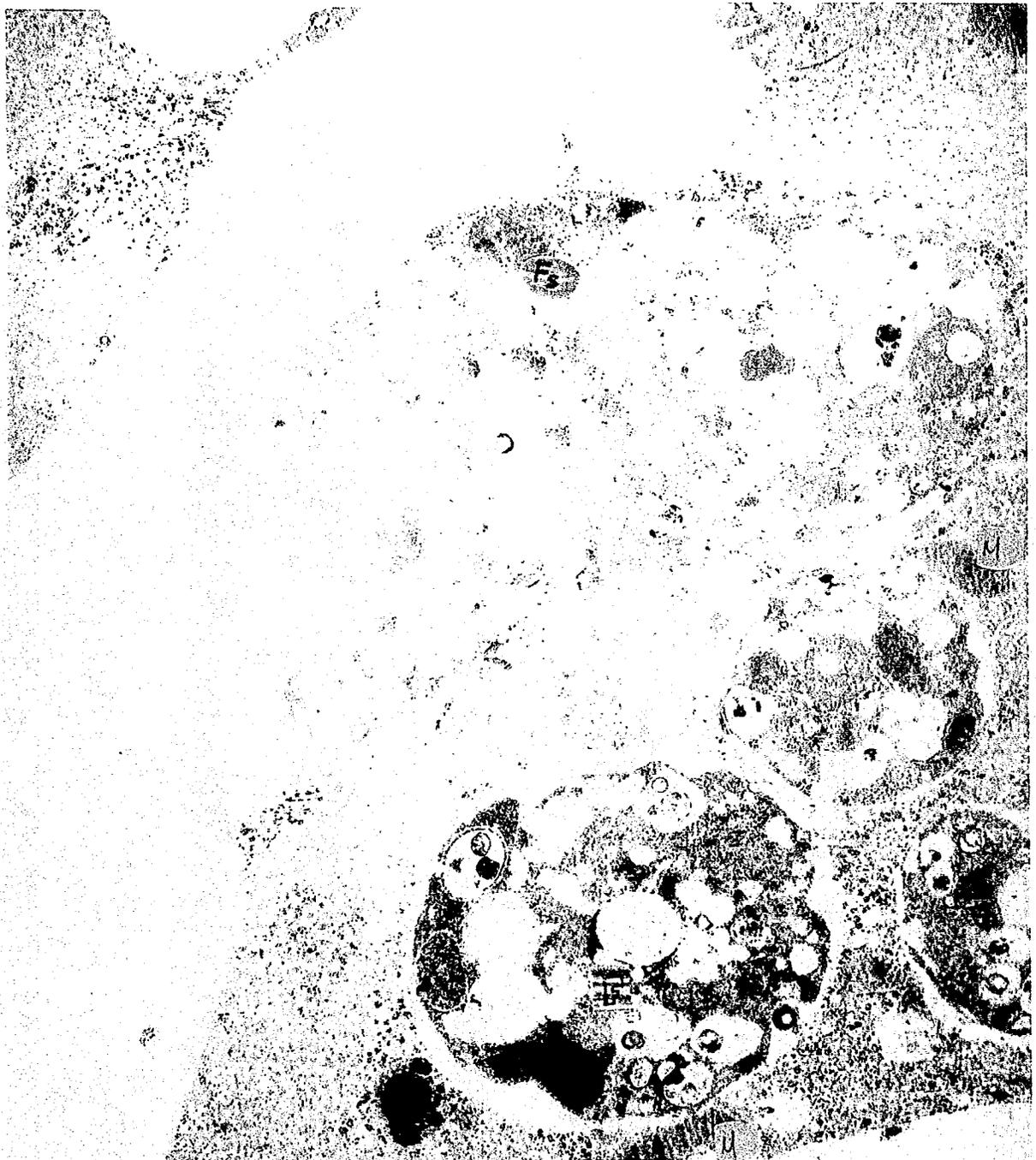
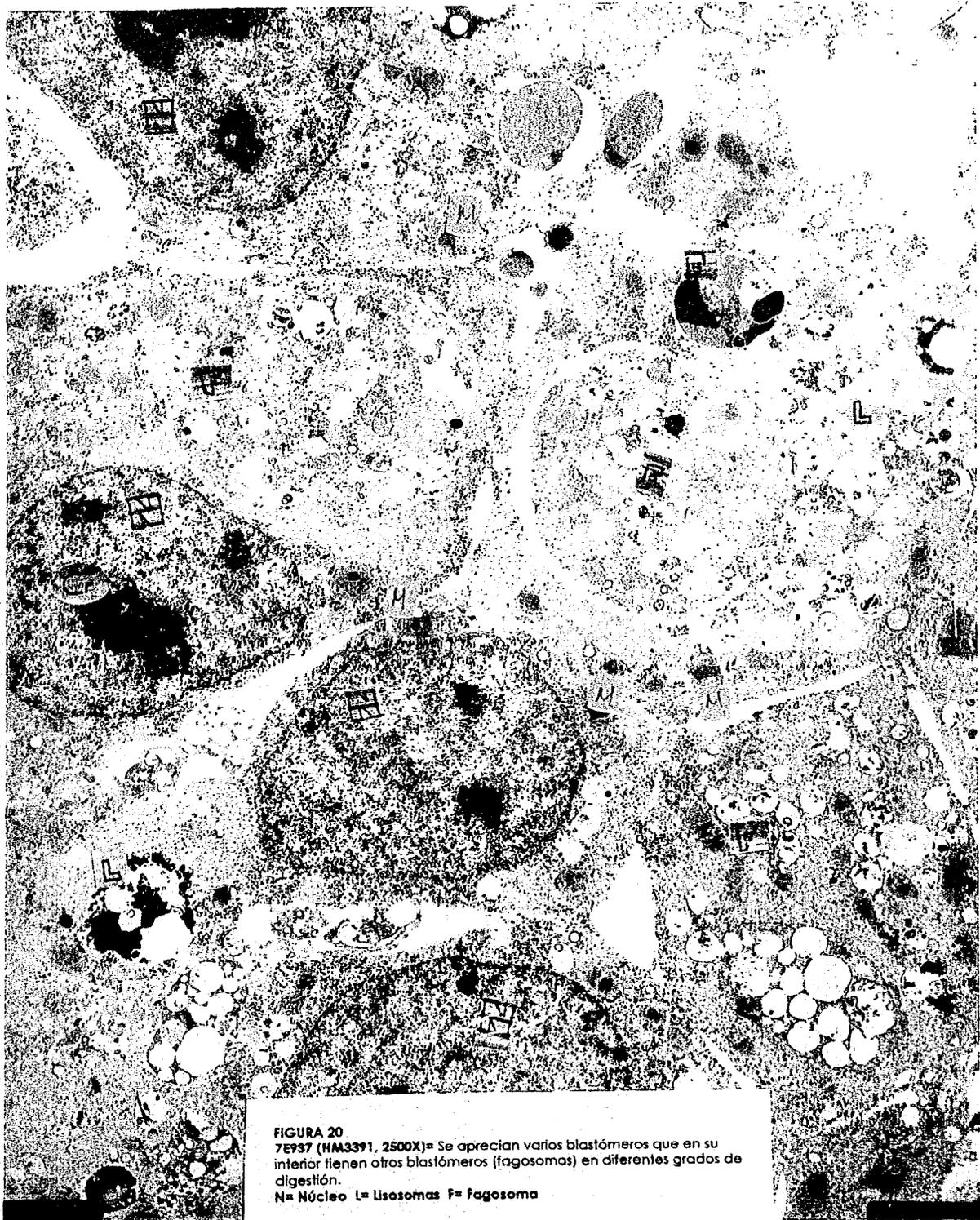


FIGURA 18  
4d397 (HM330, 6000x) Se observa un núcleo bien definido, pero se detecta un aumento en los lisosomas  
EPV= Espacio Previtelino MIC= Microvellosidades N= Núcleo Cr= Cromatina L= Lisosomas M= Mitochondrias AG= Aparato de Golgi



**FIGURA 19**  
7e397 (HM3393, 4000X) = Claramente se puede ver como se inicia una fagocitosis. Además se observan diferentes fagosomas en varios grados de digestión.  
F5=Fagocitosis F=Fagosoma.



**FIGURA 20**  
7E937 (HM3391, 2500X)= Se aprecian varios blastómeros que en su interior tienen otros blastómeros (fagosomas) en diferentes grados de digestión.  
N= Núcleo L= Lisosomas F= Fagosoma

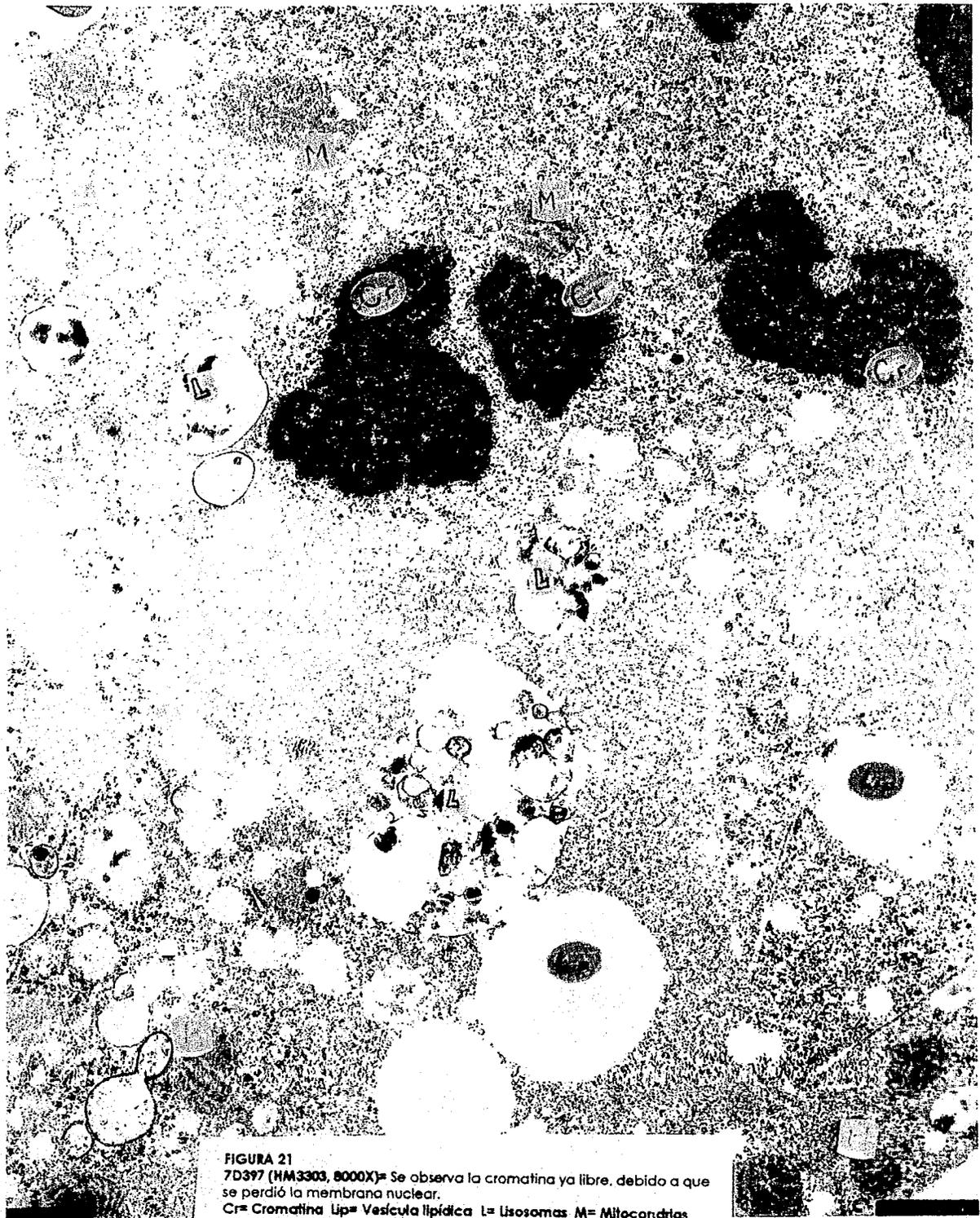


FIGURA 21  
7D397 (HM3303, 8000X) Se observa la cromatina ya libre, debido a que se perdió la membrana nuclear.  
Cr= Cromatina Lip= Vesícula lipídica L= Lisosomas M= Mitochondrias

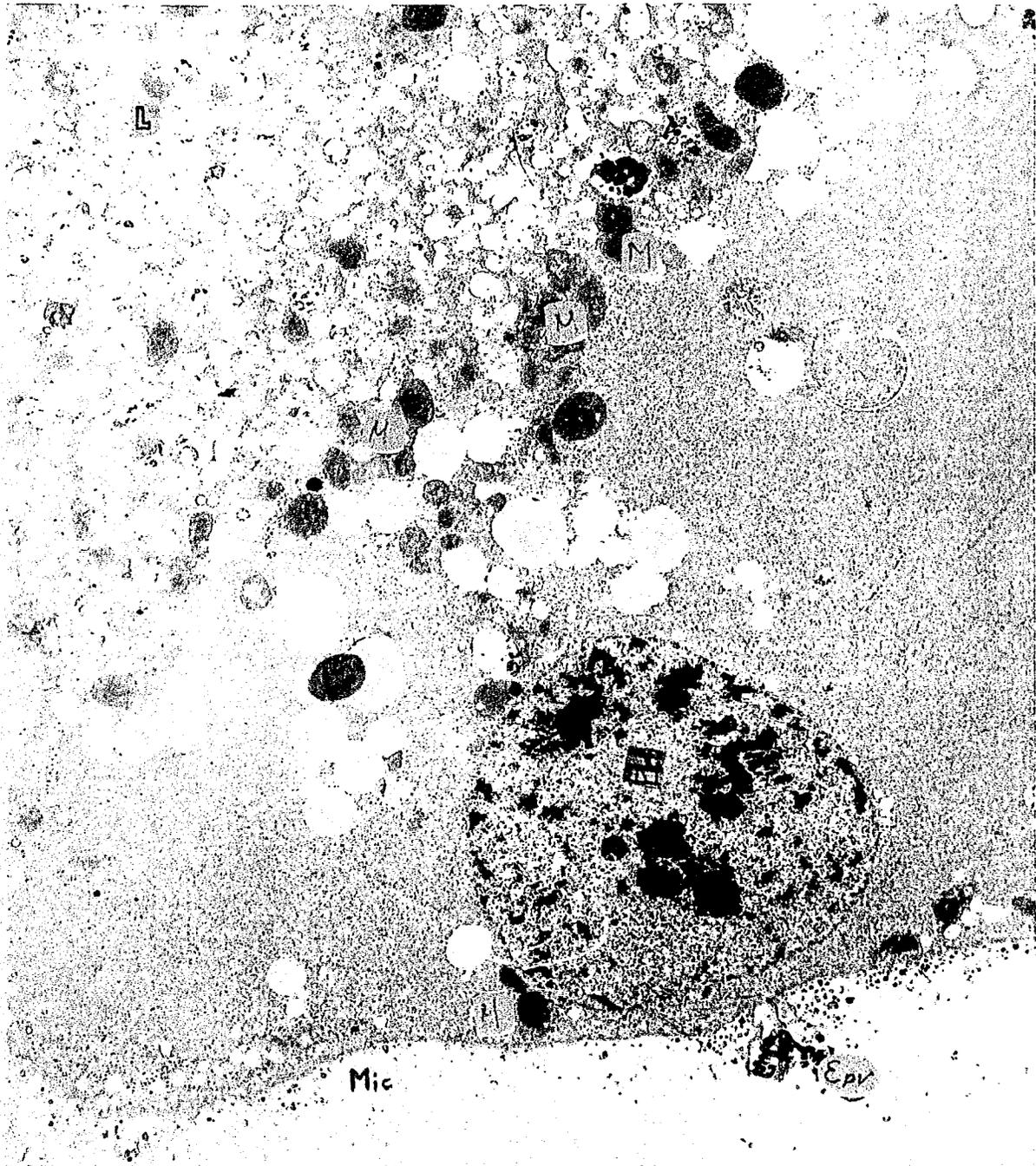
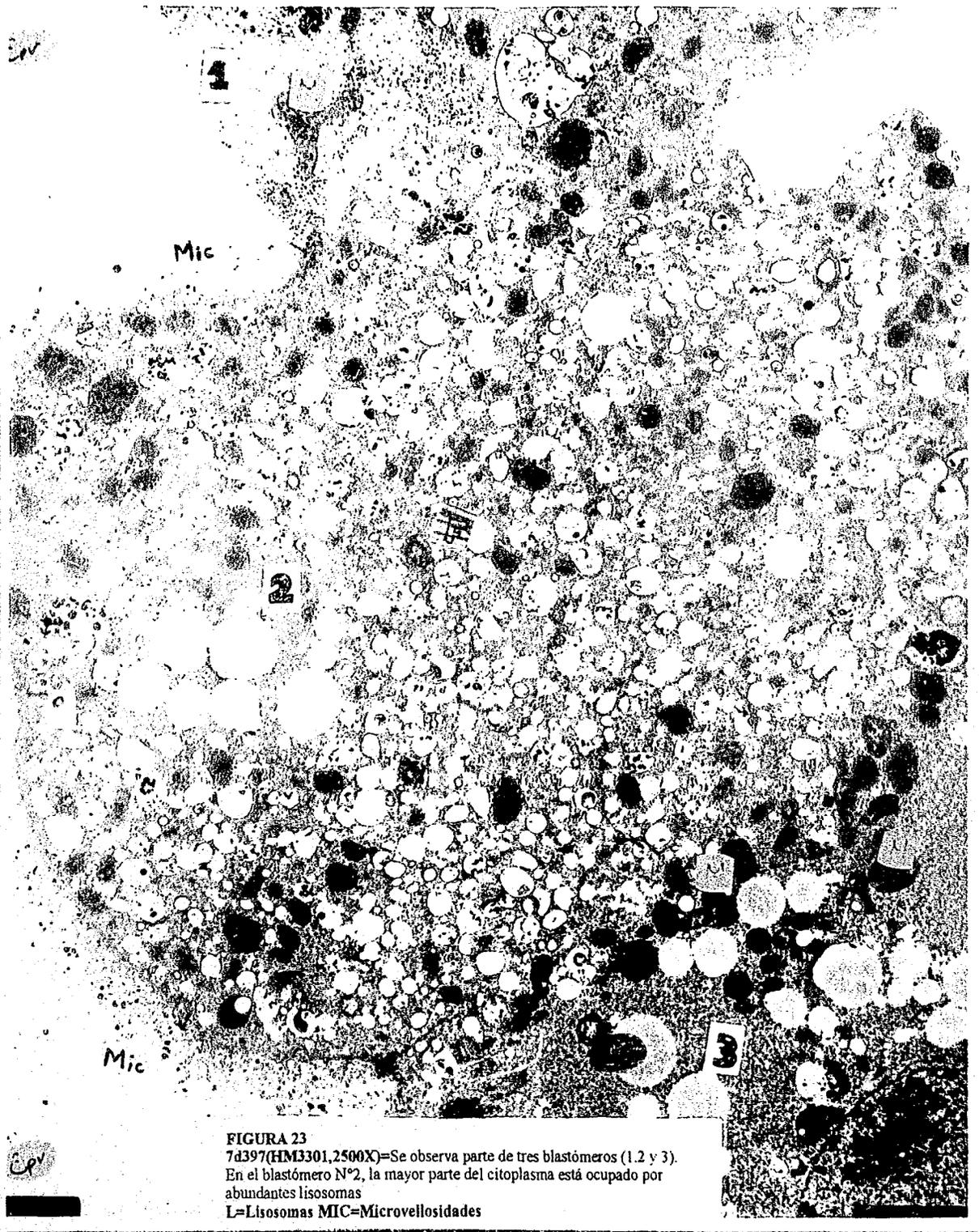
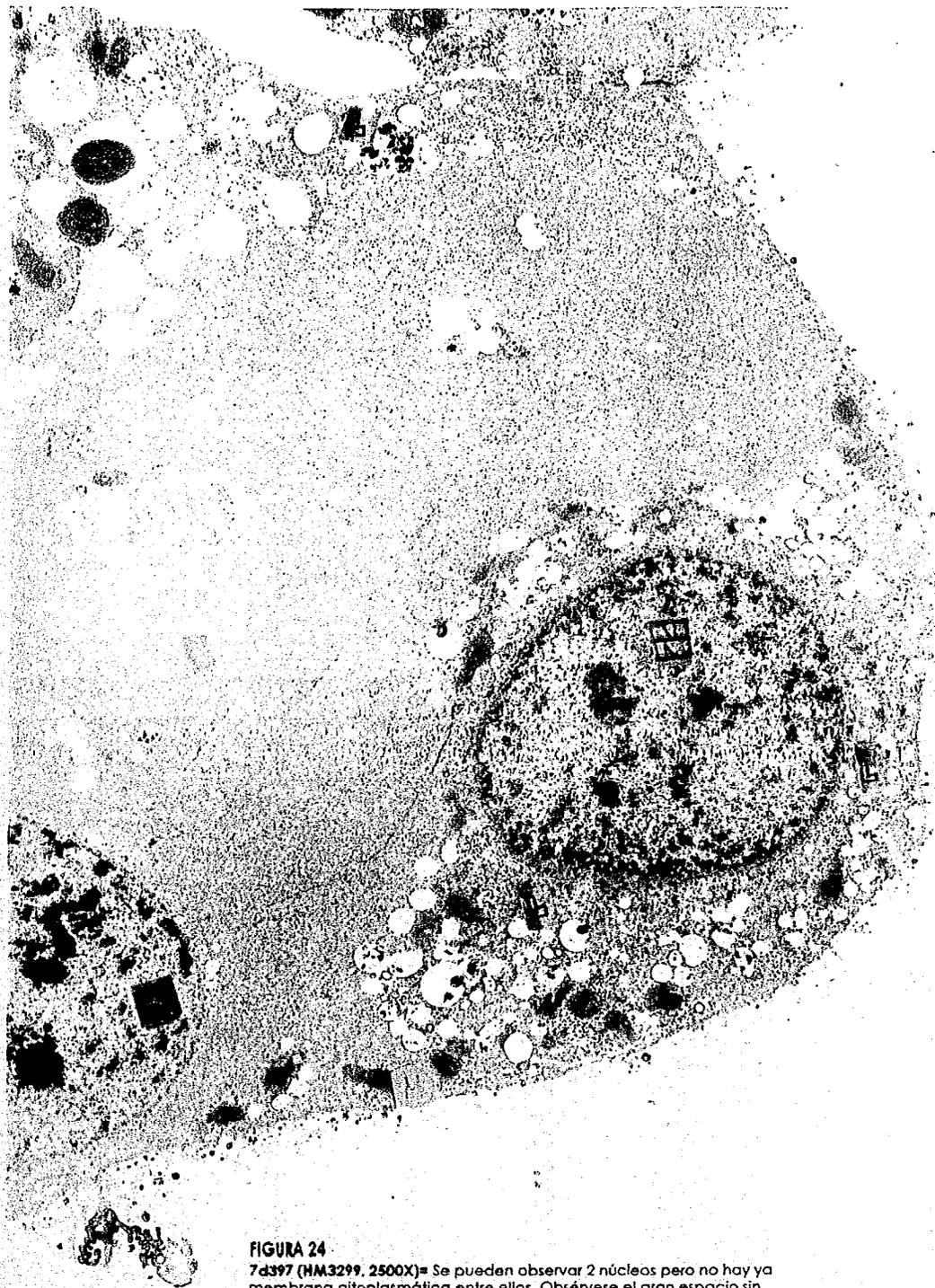


FIGURA 22  
7D397 (HM3300,2500x) =Se tiene una gran masa de lisosomas con algunas mitocondrias y vesculas lipídicas. El núcleo aun está en buenas condiciones.  
EPV= Espacio Previtelino MIC= Microvellosidades N= Núcleo Lip= Nesiícula lipídica L= Lisosomas M=Mitocondrias.



**FIGURA 23**  
7d397(HM3301,2500X)=Se observa parte de tres blastómeros (1,2 y 3).  
En el blastómero N°2, la mayor parte del citoplasma está ocupado por  
abundantes lisosomas  
L=Lisosomas MIC=Microvellosidades



**FIGURA 24**

7d397 (HM3299, 2500X) = Se pueden observar 2 núcleos pero no hay ya membrana citoplasmática entre ellos. Obsérvese el gran espacio sin estructuras y las pocas microvellosidades en la periferia.

EPV = Espacio Previtelino MIC = Microvellosidades N = Núcleo L = Lisosomas M = Mitochondrias Cit = Citoplasma