



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“SISTEMA DE CULTIVO DE EMBRIONES BOVINOS
“F1” PARA JUZGAR SU VIABILIDAD”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

DAVID ALEJANDRO CONTRERAS CARO DEL CASTILLO

TUTOR: Dr. CARLOS SALVADOR GALINA HIDALGO
COMITÉ TUTORAL: Dra. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
Dr. JAVIER JESÚS VALENCIA MÉNDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

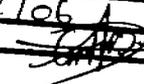


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recesional.
NOMBRE: David Alejandro Contreras
Caro del Castillo
FECHA: 1/02/06
FIRMA: 

DEDICATORIAS

A mi madre Maria del Pilar Caro del Castillo Coronado, por tu comprensión, apoyo y ayuda durante toda mi vida, por ser una mujer integra admirable y ejemplar, pero sobre todo por creer en mi y por el amor que me has dado.

A mi hermano David Fabián, gracias por ayudarme y entenderme, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí, son lo más importante en mi vida, te quiero.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Galina, por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación, por su apoyo, orientación y asesoría en mi formación profesional y humana.

A la Dra. Norma Moreno, por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo, así como por abrirme las puertas del laboratorio.

Al Dr. Javier Valencia, por tomarse tiempo para revisar este trabajo, por sus observaciones y contribución a que fuera mejor.

A los MVZ Jorge Ávila y MVZ Marco Asprón, por su invaluable colaboración en la fase de campo.

A los miembros del jurado Dr. Horacio Merchant y Dr. Jaime Gallegos, gracias por sus comentarios.

A la UNAM y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la oportunidad de prepararme para ser un mejor profesionalista y persona.

A la MVZ Griselda Valdez M, por tu apoyo y ayuda, por ser una persona muy valiosa e importante durante esta etapa de mi vida, por compartir sueños y momentos maravillosos.

A mis compañeros y amigos del departamento de Reproducción: Martín, Diana, Liliana y Dudu, por su ayuda pero sobre todo por su amistad.

A mis amigas en el laboratorio Ely y Valeria, por que desde el primer día tuvieron disposición para ayudarme y enseñarme cosas nuevas, son muy buenas en lo que hacen, ténganlo presente.

A todo el personal del departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Al proyecto PAPIIT IN-201903 por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

SISTEMA DE CULTIVO DE EMBRIONES BOVINOS "F1" PARA JUZGAR SU VIABILIDAD

ÍNDICE

| | | |
|------|---|----|
| I. | Resumen | II |
| II. | Abstract | IV |
| III. | Introducción | 7 |
| IV. | Revisión de literatura | 11 |
| | 4.1 Transferencia de embriones | 11 |
| | 4.2 Características morfológicas en embriones | 13 |
| | 4.3 Criterios de evaluación | 15 |
| | 4.4 Congelación y descongelación de embriones | 16 |
| | 4.5 Almacenamiento de embriones | 19 |
| | 4.6 Cultivo de embriones | 20 |
| | 4.7 Muerte celular | 22 |
| V. | Objetivo general | 25 |
| | 5.1 Objetivos particulares | |
| | 5.2 Hipótesis | |
| VI. | Material y métodos | 26 |
| | 6.1 Fase de campo | 26 |
| | 6.2 Fase de laboratorio | 28 |
| | 6.3 Análisis estadístico | 29 |
| VII. | Resultados | 30 |
| | 7.1 Respuesta superovulatoria | 30 |
| | 7.2 Evaluación de los embriones | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 7.3 Evaluación durante el cultivo | 33 |
| 7.4 Evaluación de la morfología en los embriones | 34 |
| 7.5 Grado de apoptosis | 36 |
| VIII. Discusión | 39 |
| IX. Conclusiones y recomendaciones | 44 |
| X. Literatura citada | 45 |

Lista de cuadros

1. Se muestra el desarrollo de 4 embriones de cada clasificación durante 12 horas en el cultivo **33**

2. El cuadro muestra los cambios en la morfología de los embriones durante las 24 horas de cultivo **35**

3. El cuadro muestra la cantidad de desechos celulares durante el cultivo **36**

Lista de figuras

- Fig. 1. Microscopia de luz en embriones bovinos de las tres clasificaciones a 30 minutos del cultivo **30**
- Fig. 2. Embriones de las tres clasificaciones, fotografías de la izquierda a 30 minutos del cultivo, fotografías de la derecha, 4 horas después de cultivo **32**
- Fig. 3. La gráfica muestra la evaluación expresada en porcentaje del desarrollo de los embriones en las 24 horas que estuvieron en el medio de cultivo **34**
- Fig. 4. La gráfica muestra el promedio de células apoptóticas en cada una de las clasificaciones, a las 4, 12 y 24 horas de cultivo **37**
- Fig. 5. Evaluación por medio de la técnica de TUNEL Embriones de las tres clasificaciones a las 24 horas de cultivo **38**

I. Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar un sistema de cultivo como una prueba no invasiva para determinar la viabilidad de embriones descongelados, y así determinar si son aptos o no para su posterior transferencia. Veinte vacas de la raza Brahman fueron sometidas a un programa de sincronización y superovulación, se inseminaron artificialmente y se realizó la recolección de embriones a los 7 días, 45 embriones fueron seleccionados y clasificados en buenos (n=15), regulares (n=15), y malos (n=15). Posteriormente fueron congelados en glicerol al 10%, se mantuvieron almacenados por un período de 5 meses; se descongelaron por el método de tres pasos y después se colocaron en holding medio® donde se estabilizaron y finalmente fueron transferidos al medio de cultivo que fue: McCoy®: 10 ml medio, 1 ml suero fetal bovino, y 20 µl de antibióticos. Los embriones fueron incubados monitoreando la morfología y el grado de desarrollo durante 24 horas por medio a los 30 minutos, 1 hora y después cada 2 horas hasta las 24 horas. Durante el cultivo cuatro embriones de cada clasificación fueron retirados, primero a las 4 horas, cuatro más a las 12 horas y los restantes hasta las 24 horas para ser procesados por la técnica de TUNEL. Los embriones de calidad buena y regular no sufrieron cambios en su estructura y continuaron con su desarrollo hasta 8 horas después de cultivados, mientras que los de mala calidad en tan sólo 2 horas de cultivo presentaron cambios indicativos de una degeneración. En la evaluación de la clasificación se encontró que a las 4 horas de cultivo, el 80 % de los embriones buenos presentaron características que concuerdan con los criterios establecidos, mientras el 20 % restante tuvo características de embriones de calidad regular, para los embriones regulares el 74 % presentó características de acuerdo a su clasificación original, mientras que 20 % mostró una morfología con mayor analogía a embriones buenos, y en el 6 % restante se observó retraso en su desarrollo. En cuanto a los de mala calidad, el 80% demostró características acordes a esa clasificación, en tanto que el 20 % restante mostró similitud a embriones de regular calidad. Al evaluar el desarrollo en las tres diferentes

clasificaciones se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los embriones clasificados como malos con respecto a los buenos y regulares. Respecto a la técnica de Tunel, los embriones de calidad buena mostraron un menor número de células apoptóticas que los de regular y mala calidad ($P < 0.05$), esto sugiere que el cultivo de embriones descongelados previamente almacenados en nitrógeno líquido puede ser utilizado como un método práctico o una prueba diagnóstica para evaluar su viabilidad.

Palabras clave: Bovino, embriones F1, cultivo, trópico, TUNEL.

II. Abstract

Frozen embryos have been stored and developing countries for many years with scarce supervision as to whether these embryos are viable. The aim of this study was to evaluate a culture system as a non-invasive means of assessing the viability of recently thawed embryos prior to transfer. Forty five embryos were collected 7 days after insemination of 20 synchronized and superovulated cows. Embryos were classified as good n=15, fair n=15 and poor n=15 and frozen in 10% of glycerol. After five months of storage embryos were incubated in McCoy© medium, morphology and stage of development were monitored for a period of 24 hours to register the development every 30 minutes the first 2 h, thereafter every hour, during the culture a portion of four embryos of each classification were separated at 4 h, another four at 12 h and the remaining seven at 24 hours and were subjected to determine the degree of apoptosis using the TUNEL technique. Descriptive statistics were used to assess the data. Embryos of good and fair quality did not suffer major changes in their development even after 8 h of incubation, whereas poor quality embryos experienced changes as early as 2 h after incubation. Good quality embryos invariably showed fewer number of apoptotic cells than those of fair and poor quality ($P < 0.05$) suggesting embryo culture to be useful in assessing viability and confirming quality of thawed embryos previously stored in liquid nitrogen, prior to transfer.

Keywords: Bovine, F1 embryos, culture, tropic, Tunel.

III. Introducción

La tecnología de la transferencia de embriones (TE), se desarrolló en sus inicios con la finalidad de optimizar los recursos genéticos y económico de los hatos. Gracias a los avances técnicos, en la actualidad se ha logrado una producción masiva de embriones que se recuperan en etapas tempranas del desarrollo, de esa manera las vacas de elevado valor comercial pueden producir un rango de 10 a 15 becerros por año, lo cual impulsa el mejoramiento genético de los hatos (Márquez *et al.*, 2003).

Desde hace más de 20 años, Madalena *et al.*, (1989) propusieron la TE como una alternativa viable para la producción de hembras F1, con un mejoramiento de la relación costo-beneficio al compararlo con los costos inherentes por la compra o producción de reemplazos. En las regiones tropicales los animales *Bos indicus* han demostrado ser superiores a los *Bos taurus* para soportar condiciones como altas temperaturas, humedad, ectoparásitos y baja calidad de los forrajes (Madalena *et al.*, 1989). La producción de embriones F1 (*Bos taurus* x *Bos indicus*) ha tenido gran éxito debido a que estos animales han demostrado ser superiores en producción y resistencia a las condiciones ambientales (Cunningham 1989; Madalena *et al.*, 1989). Sin embargo los resultados en estas condiciones son inferiores a los reportados con animales especializados en clima templado, debido a diversas circunstancias como la variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios, la dificultad en la detección de celo, la alta susceptibilidad al estrés y en algunos casos problemas anatómicos o fisiológicos (Barros y Nogueira, 2001). Esto se ve reflejado en que el número de embriones recolectados sea inferior a lo encontrado en bovinos *Bos taurus*. Asimismo, la fertilidad es menor a lo que se ha encontrado en ganado de tipo europeo. Por estos motivos la diseminación de la TE entre los productores situados en las zonas tropicales ha perdido popularidad debido a los costos de la aplicación de la técnica. Por ende continúa el problema de tener un sistema de reemplazos que sea autosuficiente. Todo esto origina que los cruzamientos

en el trópico en ganado llamado de doble propósito sea más bien aleatorio que producto de un programa de mejoramiento genético (Cunningham, 1989).

En México se han desarrollado diferentes programas gubernamentales en regiones tropicales con la finalidad de producir y transferir embriones criopreservados de tipo fenotipo F1 que ha demostrado ser por mucho el más adecuado a estas condiciones (Madalena *et al.*, 1989). Sin embargo estos programas generalmente tienden a masificarse debido a subsidios gubernamentales y decisiones políticas que posiblemente contribuyen a que los controles de calidad y criterios de selección sean menos estrictos. Asimismo, por la cantidad de embriones producidos es posible que las condiciones de almacenamiento no sean las óptimas, por ejemplo el paso de embriones de un tanque de nitrógeno líquido a otro con fines de inventario o simplemente para transportarlos del sitio de producción al lugar donde se realizarán las transferencias puede afectar la viabilidad de los mismos. Todo estas manipulaciones, además de la escasa supervisión que pueden existir en los sub-centros donde los embriones tienen que ser almacenados antes de transferirse, puede ocasionar que los niveles de nitrógeno en el tanque de almacenamiento descendan a niveles por debajo del recomendado por los fabricantes y esto ocasionar daño en los embriones a pesar de que fueron producidos con las mas estrictas normas de calidad. Todo lo anterior puede provocar que los resultados en el porcentaje de gestaciones posteriores a la TE se vea afectado. En efecto un estudio realizado por Márquez *et al.*, (2004) demuestra que los embriones que han sido evaluados y clasificados como de buena calidad al microscopio estereoscópico por personal calificado y almacenados por diferentes periodos de tiempo en nitrógeno líquido, presentan daño celular al evaluarlos por otros medios, como la técnica de TUNEL, la cual determina el grado de muerte celular (apoptosis).

En un estudio reciente, Márquez *et al.*, (2005) demostraron que la calidad de los embriones también puede variar si son producidos y congelados en la época de

sequía en comparación con la de lluvias. Estos ensayos fueron realizados evaluando la capacidad de los embriones para soportar la congelación y el daño celular observado al descongelarlos y evaluarlos por medio de la técnica de TUNEL. Anteriormente Bastidas y Randel (1987), observaron de un total de 1841 recolecciones provenientes de 813 donadoras Brahman, un máximo de 4.2 embriones por lavado durante el otoño y un mínimo de 2.9 durante el invierno, información que sugiere que el número de embriones obtenido por vaca se ve afectado por la época del año. Asimismo, encontraron que las mayores cantidades de embriones viables fueron producidos durante los meses de marzo a octubre, disminuyendo durante noviembre y diciembre, concluyendo que la diferencia de esta producción podría deberse a una mejor calidad en el alimento proporcionado a las donadoras en la época de mayor y mejor producción de forraje. Sin embargo, esta conclusión es muy discutible ya que al realizar un programa de transferencia de embriones se recomienda que las hembras donadoras sean suplementadas durante un cierto período antes de la superovulación. Obviamente se necesita mayor investigación en este tema. De igual manera Massey y Oden (1984), demostraron la existencia del efecto estacional en el porcentaje de recuperación de embriones transferibles, al obtener en vacas Brahman un promedio de 4.4 embriones transferibles en la primavera y sólo 2.6 en el invierno.

Las evaluaciones del estado y calidad de los embriones mediante el uso de técnicas invasivas permiten tener una mayor precisión en cuanto a las características de calidad y desarrollo de los embriones (Aguilar *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2004; Fouladi-Nashta *et al.*, 2005); Es obvio que la utilización de técnicas invasivas para evaluar embriones no permite mantener la integridad de los embriones, su utilización ha sido empleada para detectar problemas en la cadena de producción de embriones congelados. Así, Aguilar *et al.*, (2002) demostraron que la clasificación de los embriones realizada en fresco puede variar más de un 30%, ya que al ser evaluados por microscopía de luz y electrónica, embriones clasificados como de buena calidad mostraban

características de embriones en estado de degeneración; de igual manera Márquez *et al.*, (2004) mencionan que el tiempo de almacenamiento de los embriones almacenados en tanques de nitrógeno líquido por diferentes periodos de tiempo, pueden tener un importante efecto en su morfología al ser descongelados. Fouladi-Nashta *et al.*, (2005) describen un método en embriones bovinos, marcando dos grupos de células, las del trofoblasto y de la masa celular interna durante el cultivo, evaluando el efecto de la suplementación de suero en el medio de cultivo sobre el número total de células, además de usar la técnica de TUNEL para cuantificar el daño en los dos grupos de células, pero de igual manera son procedimientos no aplicables a embriones vivos.

Por lo tanto es necesario implementar técnicas no invasivas en donde se pueda detectar la calidad de los embriones y así tener una mayor probabilidad de que cuando se realice la transferencia, esta tenga mayor probabilidad de éxito, sobre todo en embriones almacenados en nitrógeno líquido por largos periodos, para así aumentar el porcentaje de embriones transferibles y mejorar la técnica de TE en bovinos.

IV. Revisión de literatura

4.1 Transferencia de embriones

La tecnología de la transferencia de embriones (TE), se desarrolló en sus inicios con la finalidad de optimizar los recursos genéticos y económicos de los hatos. Gracias a los avances técnicos, en la actualidad se ha logrado una producción masiva de embriones que se recuperan en etapas tempranas del desarrollo. De esa manera las vacas de elevado valor comercial pueden producir un rango de 10 a 15 becerros por año; lo cual impulsa el mejoramiento genético de los hatos.

A pesar de los avances logrados en los países desarrollados, la situación no se presenta de la misma manera para regiones de clima tropical, en donde las características de la zona, las variaciones en la temperatura, humedad y manejo de los sistemas productivos son diferentes y por ende la respuesta superovulatoria puede ser muy variable, lo que resulta en un alto número de embriones anormales o con retardo en el desarrollo (Kafi y McGowan, 1997). En efecto Rutledge (2001), observó que existe una relación lineal entre la calidad del embrión y la temperatura ambiental, así, por cada grado centígrado de incremento en la temperatura, durante el período entre la inseminación y la recolección de embriones, aumenta en un 15% la proporción de embriones clasificados como de regular o mala calidad.

En las regiones tropicales del mundo la producción de embriones F1 ha ganado mucha popularidad entre pequeños productores, debido al mejoramiento (vigor o heterosis) que se observa en la capacidad productiva y reproductiva, resistencia a enfermedades y adaptabilidad al medio entre la cruce de la razas *Bos taurus*/*Bos indicus* (Cunningham, 1989). En el caso de México al ser un país en vías de desarrollo el gobierno ha implementado programas en los que se han producido embriones de forma masiva para distribuir embriones entre los productores y así lograr un avance más rápido en las diversas explotaciones del país. De esta

manera, el programa LICONSA (Leche Industrializada Conasupo), produjo un total de 75,000 embriones del año 1986 a 1992, de los cuales se transfirieron 3000 en fresco y el resto fueron congelados para ser distribuidos entre universidades, gobiernos de los estados, asociaciones ganaderas, de todo el país (Valencia, comunicación personal), además de este esfuerzo a nivel federal, gobiernos como en el Estado de Chiapas crearon su propio programa como es el caso del Fideicomiso para el Mejoramiento de la Ganadería Tropical (FIMEGEN) con el fin de promover la técnica de transferencia de embriones (TE) entre productores de doble propósito, además de distribuir los embriones producidos por LICONSA al mismo tiempo de iniciar con un programa estatal de producción de embriones utilizando razas europeas inseminadas con toros de tipo Cebú. En estos programas se produjeron embriones a escala industrial con la desventaja de que al realizar la evaluación de los mismos estas posiblemente fueron hechas por diferentes técnicos con la inherente variación que esto conlleva (Farin *et al.*, 1995). Por ende es probable que estos embriones hayan sido congelados con distintos criterios en cuanto a su calidad. En un estudio realizado por Aguilar *et al.*, (2002) demostraron que la clasificación de los embriones realizada en fresco puede variar más de un 30%, ya que al fijarlos en Karnovsky modificado para ser evaluados por microscopía de luz y después por microscopía electrónica, embriones clasificados como de buena calidad mostraban características de embriones en estado de degeneración. Aunado a lo anterior Márquez *et al.*, (2004) demostraron que el tiempo de almacenamiento en los embriones en tanques de nitrógeno líquido pueden tener un importante efecto es su morfología después de ser descongelados. Todo lo anterior podría producir una variabilidad muy grande en los resultados en la fertilidad y porcentaje de gestaciones esperados debido a que en muchas ocasiones se desconocía con exactitud la procedencia, el tiempo y condiciones de mantenimiento previas a la transferencia.

4.2 Características morfológicas en embriones

El desarrollo embrionario y la diferenciación requieren de una serie de pasos consecutivos y de cierta manera simultánea que son: segmentación, compactación, formación del blastocele, expansión y maduración de la zona pelúcida. La presentación de estas características y el tiempo que transcurre entre ellas son usados como indicador de salud y calidad embrionaria (Occhio *et al.*, 1999).

En el embrión bovino la sucesión de eventos se da aproximadamente de la siguiente manera: la primera segmentación se produce a las 48 horas después de haber sido fertilizado, para las 72 horas será de 8 células, a partir del 5 día consta de 16 a 32 células y se denomina mórula, después de esto se establece la compactación de los blastómeros para más adelante comenzar a secretar líquido para la formación del blastocele y esto se puede apreciar hacia el día 6 ó 7. En el desarrollo de un embrión bovino de manera natural es aproximadamente hacia el día 9 cuando se produce la eclosión de la zona pelúcida (Shea 1981, Mohr y Trounson, 1981).

En general un embrión bovino de alrededor de 7 días cuenta con un diámetro de $193.5 \pm 28.4 \mu\text{m}$. La zona pelúcida es de aspecto rugoso presentando blastómeros pequeños y redondeados, a veces puede observarse que están separados por pequeños espacios intercelulares (Fléchon y Renard, 1978). Es indispensable la integridad de la membrana plasmática de los blastómeros debido a que esta funciona como una barrera selectiva con respecto al medio extracelular estableciendo y manteniendo de manera temporal el gradiente iónico, el pH, así como el intercambio de sustancias y mecanismos de transporte intracelular (Overstrom, 1996). De la misma forma al realizar una evaluación por medio de microscopia de alta resolución se puede observar que el citoplasma es electrodenso con un citoesqueleto bien desarrollado (King *et al.*, 1992), son abundantes las mitocondrias de formas redondeadas o alargadas, y están

asociadas a los retículos endoplasmáticos rugosos y lisos; el aparato de Golgi es conspicuo y es frecuente encontrar formaciones de membranas en el citoplasma perinuclear. Los abundantes polirribosomas están intercalados en el retículo endoplásmico rugoso. Además, es normal encontrar vesículas lipídicas que deben irse reduciendo en número después del día 7 (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994). Inicialmente el cuerpo precursor del nucleolo se transforma en un anillo vacuolado, posteriormente se observa ya reticulado y es totalmente activo (King *et al.*, 1992). La cavidad del blastocele contiene material granular fino (Mohr y Trounson, 1981; Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994).

En el trofoblasto se observan microvellosidades en la cara externa de la membrana, y las células epiteliales son planas; también pueden observarse vesículas picnóticas no muy abundantes (Mohr y Trounson 1981; King *et al.*, 1992); sus células están ancladas entre sí y a otros blastómeros, por desmosomas y uniones apicales (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994). A veces pueden encontrarse muchos filamentos finos asociados a los desmosomas y se extienden a lo largo de la unión entre células del trofoblasto. Se cree que estos filamentos tengan una función estructural en la célula, dándole forma, rigidez y soporte.

Todos estos criterios morfológicos apuntan a que para tener una evaluación embrionaria adecuada de organismos obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* sin alterar la integridad de los mismos ya sea en fresco o posterior a una descongelación es posible que sea por medio del cultivo, ya que este permite extender el tiempo para poder observar si es que los embriones continúan con su desarrollo y así poder determinar su viabilidad (Shea 1981).

4.3 Criterios de evaluación

El aspecto de mayor importancia para el éxito de la TE es la evaluación de la morfología así como el estado de desarrollo embrionario y calidad, la cual se realiza por medio de la observación al microscopio estereoscópico (Lindner y Wright., 1983). Sin embargo, aunque ha habido grandes avances en la TE, los resultados obtenidos hasta el momento no han sido del todo satisfactorios. En un estudio realizado por Farin *et al.*, (1995) reportaron que técnicos con experiencia al momento de evaluar 40 embriones de distinta clasificación en diferentes estadios de desarrollo y grado de degeneración sólo acordaron en el 68% de las observaciones, difiriendo en mayor grado entre los embriones de buena y regular calidad. En otro estudio Rondeau *et al.*, (1995), evaluando el metabolismo de embriones reportaron que 47% de los clasificados como de buena calidad no tenían actividad metabólica normal, debido quizá a defectos funcionales que no pueden ser detectados en la evaluación estereoscópica. Asimismo Aguilar *et al.*, (2002) demostraron que el criterio de evaluación de los embriones en el campo por medio del uso de microscopia estereoscópica puede variar hasta en un 30%, cuando se comparan las evaluaciones de los embriones por este método con técnicas más precisas como es la microscopia electrónica. Este tipo de hallazgos explica parcialmente porqué la fertilidad después de transferir embriones no rebasa el 40% ya que es muy probable que algunos embriones sean transferidos cuando su grado de deterioro celular le impide llevar a cabo una gestación.

Los criterios establecidos por Lindner y Wright (1983), para la clasificación de la calidad de los embriones por medio de microscopia estereoscópica se dividen en a) Bueno.- Embrión esférico con tamaño, color y textura uniformes, sin o con algunas vesículas. b) Regular.- Presenta algunos blastómeros rugosos, varias vesículas y algunas células degeneradas y c) Malo.- Muchos o casi todos los blastómeros son rugosos, células degeneradas y/o de varios tamaños, numerosas vesículas de gran tamaño, pero se logra distinguir la masa

embrionaria. En 1998 la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) publicó en su manual un sistema para otorgar la clasificación de calidad de embriones bovinos en grados con números arábigos, sin embargo en un estudio realizado por Hasler en 2001, reporta que los criterios de evaluación observados concuerdan más con los de Lindner y Wright (1983), así como que no hay una aplicación constante de los criterios en grados para la evaluación morfológica en embriones bovinos.

Debido a los diversos criterios que existen para evaluar embriones por medio de microscopía estereoscópica en la que se ha demostrado que puede haber una variación de hasta un 30% (Aguilar *et al.*, 2002), se ha optado por el uso de la microscopía de luz sin embargo a partir de aquí se requiere de la fijación lo que implica el sacrificio de los embriones, con lo que se pierde cualquier oportunidad de seguir evaluando la morfología o desarrollo, de igual forma en la microscopía electrónica y técnica de TUNEL se tiene mayor precisión pero es necesario la implementación de técnicas no invasivas para poder determinar la viabilidad de los embriones.

4.4 Congelación y descongelación de embriones

Además de la problemática observada en la evaluación, también deben considerarse los cambios que suceden al congelar y descongelar los embriones. La criopreservación es un procedimiento complejo que no garantiza el obtener una eficacia total, los principios básicos persiguen dar una protección de la célula frente a los efectos perjudiciales del proceso (Dobrinsky 1996). Durante el procedimiento de congelamiento, los embriones son expuestos a niveles potencialmente tóxicos de crioprotectores y se están alterando las condiciones fisiológicas de las células, además de ser sometidos a solidificación durante el enfriamiento (Baguisi *et al.*, 2000). Todos estos cambios pueden producir la muerte del embrión, que es atribuida a la reducción del volumen de la célula por debajo de un límite crítico, donde la deshidratación osmótica le provoca un

estrés que origina una pérdida de lípidos de la membrana celular (Schneider *et al.*, 1984). La criopreservación produce una exposición de los tejidos a temperaturas muy bajas fuera de lo fisiológicamente aceptable antes de que se inicie la congelación, los daños ocurren a temperaturas entre los +15° C y -90°|C. Cuando la temperatura se reduce por debajo de 0° C se produce el riesgo de la formación de hielo intracelular y esto aumenta con la disminución de la temperatura. Para prevenir la formación de cristales de hielo y disminuir el daño en la célula se han desarrollado diferentes protocolos con crioprotectores para la deshidratación de las células, los cuales contienen una alta concentración extracelular de solutos y, al poner las células en una solución de este tipo y bajar la temperatura provoca el paso de un estado líquido a un estado sólido y la extracción de agua del interior de las células. La mayoría de procedimientos usados para criopreservar embriones, ovocitos y tejido ovárico estipulan un rango de enfriamiento de 0.3 a 0.5° C/ minuto a partir de la cristalización (fenómeno conocido como "seeding" en inglés), que se da entre -5° C a -9° C, y la temperatura baja hasta los -33° C a -40° C, al llegar hasta ahí pueden ser transferidos al nitrógeno líquido (Jousan *et al.*, 2004, Ruffing *et al.*, 1993).

En el caso de embriones regulares o malos que son mal evaluados y sometidos al proceso de congelación, lo más probable es que estos no resistan y mueran durante el proceso o se vean afectados de manera irreversible, provocando que ninguno de estos embriones logre tener éxito al ser transferidos, y este sea un motivo más por el cual la fertilidad en la técnica de TE sea tan baja.

Todos los procedimientos anteriores se basan en el potencial de la célula para resistir la exposición al glicerol que es el crioprotector utilizado en este tipo de protocolos.

Un método más reciente para la criopreservación es la denominada vitrificación o congelación ultrarrápida, que comúnmente utiliza como crioprotector al

etilenglicol en una concentración que va de 1.5 a 3.6 M, y la cual solamente requiere de una dilución en un solo paso. Un beneficio importante es que no hay formación de cristales de hielo, además de la reducción en el tiempo requerido para equilibrar los embriones y llevarlos hasta los -196°C , que en la congelación convencional es de 90 minutos y con el uso de esta técnica se reduce a menos de 25 minutos. El uso de etilenglicol como crioprotector ha demostrado diferencias entre los embriones producidos *in vivo* e *in vitro* en cuanto a su morfología, viabilidad y sobrevivencia posterior al descongelamiento, siendo más favorable para los embriones obtenidos *in vitro*, ya que al parecer los producidos *in vivo* sufren daños en la capa de células del trofoblasto (Sommerfeld y Niemann 1999).

Visintin *et al.*, (2002) observaron que durante la vitrificación, los embriones de vacas Holstein y Nelore exhiben condiciones morfológicas similares. La congelación de los embriones *Bos taurus* y *Bos indicus* aparentemente mantiene su desarrollo y estructura comparado con embriones en fresco, sin embargo un análisis más detallado muestra que las células embrionarias principalmente en ganado *Bos indicus* de raza Nelore muestra alteraciones significativas, donde las células embrionarias presentaron cualitativamente signos de degeneración y muerte celular comparada con embriones en fresco. Una de las características más comunes es la hinchazón de las células con daños citoplasmáticos y vacuolización del núcleo, hallazgos que son similares a los observados durante el proceso de muerte celular como necrosis o en células que presentan estrés hiperosmótico, que son características de alteraciones en la permeabilidad de la membrana.

Los reportes de gestación con el uso de la vitrificación mencionan entre un 40 a 55% de preñez (Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1995), lo cual no difiere en gran medida con los resultados obtenidos por medio de los métodos convencionales de congelación.

Para el procedimiento de descongelación existen varios métodos entre los que se incluyen la disminución de la concentración del crioprotector en varios pasos, con el inconveniente de que este lleva entre 20 a 60 minutos completarlo por cada embrión, complicando el poder descongelar varios de manera simultánea y tomando mucho más tiempo para llevar a cabo un mayor número de transferencias. Lo anterior tiene implicaciones en la práctica veterinaria, debido a que llevar a cabo procedimientos de TE en una explotación representa diversos gastos, tales como la preparación de las receptoras que por lo general son animales que reciben un trato especial durante un período previo a la transferencia, que incluye una mejor alimentación, programas de vacunación, la administración de vitaminas o desparasitantes, así como contar con personal para el manejo de los animales durante las transferencias.

Otro método es la descongelación en un solo paso lo cual permite la transferencia directa como en la inseminación artificial, sin la necesidad de extraer el embrión de la pajilla (Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1995), sin embargo al realizarlo de esta manera aunque ha agilizado en gran parte este tipo de procedimientos, no es posible conocer el estado del embrión que se encuentra dentro de la pajilla, y en algunos casos no se tiene conocimiento de la procedencia de los embriones a transferir.

4.5 Almacenamiento de embriones

En la actualidad el almacenamiento de material biológico dentro de termos o contenedores que contengan nitrógeno líquido es una práctica habitual debido a que este gas licuado provee la temperatura ideal (-196° C) para preservar estructuras que han sido previamente sometidas a un proceso de criopreservación en un medio adecuado, sin embargo en condiciones de campo en las que el control de estos depósitos no son tan estrictos o sean sujetos de una mal manejo puede ocurrir inconsistencias en el suministro adecuado de

nitrógeno líquido dejando el material con bajos niveles del nitrógeno indispensable para el almacenamiento de material driporeservado.

En efecto un estudio realizado por Márquez *et al.*, (2004) se demostró como embriones que fueron evaluados y clasificados como de buena calidad al microscopio estereoscópico por personal calificado y almacenados por diversos periodos en nitrógeno líquido, al evaluarlos por otros medios como la técnica de TUNEL, se encontró que si hay un incremento significativo en el número de células con proceso de apoptosis en embriones almacenados durante 13 años comparándolos con embriones que tan sólo se almacenaron por tan sólo 2 años. En parte esto sugiere que probablemente el daño celular observado en células embrionarias podría deberse a diversos factores como puede ser una deficiente evaluación en fresco posterior al lavado, que se realiza previo al proceso transferencia o congelación para otorgar una clasificación e identificación de los mismos, asimismo el deterioro celular pudiera ser provocado por fallas en el proceso de almacenamiento o durante el tiempo que se encuentran en el termo de nitrógeno líquido, ya que si el volumen de embriones es muy grande se vuelve más difícil el tener un buen control sobre los diferentes centros en los que se encuentren los embriones, y esto se ve reflejado al momento de realizar una evaluación de los porcentajes de preñez obtenidos, ya que se encuentran por debajo de lo esperado.

4.6 Cultivo de embriones

El cultivo de embriones se ha utilizado con mayor frecuencia por la implementación de técnicas como la producción *in vitro* de los mismos, sin embargo el uso de medios de cultivo se encuentra limitado debido al poco conocimiento del metabolismo y requerimientos para el adecuado desarrollo de los embriones, de igual manera se ha demostrado que diversos componentes en diferentes medios de cultivo han tenido efectos negativos en la calidad y viabilidad de los embriones (Mastromonaco *et al.*, 2004).

Algunos de los medios más comunes utilizados en el desarrollo de embriones bovinos son el medio de cultivo para tejidos TCM 199 y el Menezo's B2, los dos han sido descritos como medios complejos debido a sus componentes entre los que incluyen vitaminas, aminoácidos, sales, nucleótidos (Bavister, 1995).

El desarrollo embrionario *in vitro* es influenciado por diversos factores, tales como el co-cultivo con células somáticas, la adición de antioxidantes y oxígeno, además el número de embriones en el medio de cultivo es importante ya que el desarrollo es mejor cuando se cultivan en grupo que de manera individual, esto debido a la secreción de factores de crecimiento por los mismos embriones que probablemente promuevan el desarrollo de los demás (Pereira *et al.*, 2005). En cuanto al metabolismo se han logrado evaluar parámetros entre los que se encuentra la glucosa, que es necesaria para la formación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas durante el desarrollo, de esta forma se ha reportado que mientras mayor sea la utilización de la glucosa aumentan las posibilidades de viabilidad posteriores a la transferencia (Gardner 1987).

En la actualidad hay diferentes sistemas de cultivo de embriones que permiten el desarrollo de éstos hasta etapas en las que podrían ser transferidos y lograr una gestación exitosa (Goto *et al.*, 1988). Thompson (1996) sugiere que los componentes a tomar en cuenta para un medio de cultivo son: temperatura, pH, CO₂, oxígeno, carbohidratos, aminoácidos, lípidos y ácidos grasos, factores de crecimiento y proteínas, mismos que se encuentran en prácticamente todos los medios de cultivo comerciales. Sin embargo existen limitantes para que el uso de estos se lleve a cabo de manera rutinaria como son, los altos costos, la disponibilidad, así como los requerimientos para su funcionamiento, de hecho, su uso sólo se limita a hacerlo de forma experimental, al realizar evaluaciones para comparar el desarrollo de embriones producidos por fertilización *in vitro*, versus embriones de origen *in vivo*, y los resultados obtenidos no han sido muy alentadores para los embriones producidos *in vitro* ya que los *in vivo* siempre

han mostrado porcentajes de desarrollo superiores, bajo cualquier tipo de condiciones (Pereira *et al.*, 2005 y Brandao *et al.*, 2004).

Pereira *et al.*, (2005) y Brandao *et al.*, (2004) han evaluado diferentes sistemas de cultivo en embriones a diferentes etapas de desarrollo, así como prolongar el tiempo de cultivo hasta etapas posteriores a la eclosión. En ambos casos se ha evaluado el potencial de los embriones para soportar las condiciones del medio de cultivo y se ha demostrado que los embriones poseen la capacidad de desarrollarse y mejorar sus características morfológicas, de igual manera embriones han llegado hasta etapas en las que da inicio la diferenciación de varios linajes celulares, el inconveniente en ambos casos es que al someter los embriones a cualquier procedimiento en el que uno de los parámetros de evaluación sea la eclosión la transferencia tiene menor probabilidad tener éxito.

Con el uso de un medio de cultivo pueden ser evaluadas diferentes características como morfología, etapa y grado de desarrollo, así como calidad embrionaria, por lo tanto podría ser implementado como una prueba en la que embriones descongelados puedan ser evaluados antes de ser transferidos, determinando su viabilidad en tan sólo unas horas.

4.7 Muerte celular

La apoptosis (muerte celular programada) es considerada una muerte celular autodirigida, la cual se basa en mecanismos genéticos, activación enzimática, y fragmentación de ADN que afectan una célula y que pueden ser iniciados por un reloj interno o igualmente por acción de agentes extracelulares, con la finalidad de eliminar células anormales o células con un potencial inadecuado de desarrollo (Manjo y Joris 1995).

El mecanismo de apoptosis morfológicamente se caracteriza porque la célula se encoge, hay condensación citoplasmática y de la cromatina y se presenta

fragmentación del ADN. Durante la fase final del proceso apoptótico, el núcleo puede romperse formando fragmentos nucleares picnóticos, así, la membrana citoplasmática forma cuerpos apoptóticos, que pueden ser fagocitados por macrófagos o células vecinas (Betts y King 2001).

El proceso de apoptosis también ha sido descrito en diferentes etapas del desarrollo embrionario, estudios ultraestructurales han reportado la presentación de muerte celular espontánea en blastocistos de diferentes especies incluyendo bovinos, sugiriendo que este podría ser el mecanismo por medio del cual los embriones pueden eliminar células de la masa interna, y que poseen el potencial de eliminar células anormales o con un inadecuado de desarrollo (Byrne *et al.*, 1999).

Byrne *et al.*, (1999) encontraron la presencia de células con características apoptóticas en embriones bovinos de 9 a 16 células, estando ausente en etapas anteriores, lo que podría indicar que existe una sincronía entre el momento que se activa la maquinaria genómica y los mecanismos apoptóticos, y pueden tener como objetivo la eliminación de células no viables en un embrión en desarrollo.

La apoptosis está muy relacionada con la calidad del embrión, Byrne *et al.*, (1999) demostraron que los blastocistos con menor número de células y mayor incidencia de características apoptóticas, poseen menor potencial de desarrollo al ser cultivados. Esto demuestra que cuando el porcentaje de muerte celular llega a un nivel crítico el desarrollo embrionario se detiene a pesar de ser un mecanismo fisiológico. En efecto en un estudio reciente (Márquez *et al.*, 2004), demostraron como embriones que han sido evaluados y clasificados como de buena calidad al microscopio estereoscópico por personal calificado y almacenados por diferentes periodos en nitrógeno líquido, presentaron daño celular al evaluarlos por otros medios como la técnica de TUNEL que detecta el grado de apoptosis.

De la misma manera Fouladi-Nashta *et al.*, (2005) desarrollaron un método en el que se puede evaluar la producción de embriones provenientes de cultivos *in vitro* por medio de la técnica de TUNEL, marcando a dos grupos de células, las del trofoblasto y las de la masa celular interna durante el cultivo, sin embargo esta también es una técnica terminal e invasiva que no es aplicable a embriones vivos. Por la información anterior se ha puesto de manifiesto la necesidad de contemplar evaluaciones posteriores a la descongelación de los embriones y previas a la transferencia como el cultivo, ya que en algunos casos la transferencia se podría llevar a cabo cuando el daño celular comprometa la viabilidad del embrión afectando el éxito de la transferencia de embriones de forma negativa.

V. Objetivo general

Implementar el cultivo de embriones bovinos como una prueba no invasiva, para evaluar sus características morfológicas y grado de desarrollo, determinando si son viables para ser transferidos.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar el grado de desarrollo de los embriones cultivados por medio de características morfológicas a través de microscopía de luz.
- Analizar por la técnica de TUNEL el grado de muerte celular en embriones cultivados.

5.2 Hipótesis

La técnica de cultivo en embriones bovinos, permitirá establecer si su calidad y viabilidad los hace aptos para su posterior transferencia.

VI. Material y métodos

6.1 Fase de campo

Localización

La producción de embriones se llevó a cabo en el rancho "La Colorada" arrendado por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, situado a 20°4' latitud Norte y 97°3' longitud Oeste. La altura con relación al nivel del mar es de 151m. El clima está clasificado como Af (m) w^r (e) caliente y húmedo, con lluvias todo el año, sin estación seca definida. La precipitación pluvial media anual es de 1991 mm y la temperatura promedio anual es de 23.7° C, con un rango entre 14 y 35° C (García 1981).

Animales

Se utilizaron 20 vacas Cebú de la raza Brahman, los animales fueron sometidos a una evaluación ginecológica mediante palpación rectal para verificar que se encontraran libres de alteraciones anatómicas y fisiológicas que pudiera afectar su fertilidad.

Superovulación e inseminación artificial

Los animales se sincronizaron mediante la aplicación de dos inyecciones de 25 mg de PGF2 α (Lutalyse-Upjohn Pharmacia, México) para inducir la aparición del celo aproximadamente 2 días después (celo = día 0). La siguiente aplicación de prostaglandina se realizó a los 14 días. Las vacas que presentaron celo (permitir la monta por otra hembra) fueron sometidas al proceso de superovulación, a través de la aplicación de 240mg de la Hormona Folículo estimulante (Folltropin V-Litton, México), a dosis decrecientes durante los días 9, 10, 11, y 12 del ciclo estral (Lindsell *et al.*, 1986); en el día 11 por la tarde y en el

12 por la mañana se aplicaron 25 mg de PGF2 α para la inducción del celo, los días 13 y 14 se realizó la inseminación artificial a las 12 y 24 horas posterior a la detección del celo. Los animales fueron inseminados con semen de toro Holstein de calidad probada. La recolección de embriones se llevó a cabo por medio de lavados uterinos 7 días posteriores a la primera inseminación.

Evaluación de los embriones

Los embriones fueron evaluados por un técnico y clasificados en fresco con microscopio estereoscópico de acuerdo a los criterios establecidos por Lindner y Wright (1983):

- **Bueno.-** Embrión esférico con tamaño, color y textura uniformes, sin o con algunas vesículas.
- **Regular.-** Presenta algunos blastómeros rugosos, varias vesículas y algunas células degeneradas
- **Malo.-** Muchos o casi todos los blastómeros son rugosos, células degeneradas y/o de varios tamaños, numerosas vesículas de gran tamaño, pero se logra distinguir la masa embrionaria.

Congelación

La congelación se realizó en glicerol al 10%. Los embriones fueron colocados en pajillas de manera individual, se colocaron a -6° C durante 2 minutos y se realiza la inducción de la cristalización, en el segundo paso, 10 minutos después se reduce la temperatura 0.5 ° C por minuto hasta -35 ° C y se transfirieron a nitrógeno líquido (Josuan *et al.*, 2004).

6.2 Fase de Laboratorio

Los embriones en estadio de mórula y blastocisto se mantuvieron almacenados en un termo con nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C por un período de 5 meses, durante este periodo de tiempo los niveles del termo fueron monitoreados 1 vez al mes y se recargaba hasta niveles óptimos recomendados por el fabricante.

Descongelación

La descongelación se llevó a cabo por el método de tres pasos, se extrajeron las pajillas del termo de nitrógeno, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 segundos, después se depositaron en un termo con agua a 37°C por 10 segundos. A continuación se transfirió el contenido de la pajilla a concentraciones decrecientes del glicerol por 7 minutos en cada paso y después se colocaron en holding Plus® el cual es un medio que contiene ingredientes necesarios para mantener los embriones a temperatura ambiente, además de aminoácidos, factores de crecimiento, antibióticos en donde se estabilizaron y finalmente fueron transferidos al medio de cultivo que contiene McCoy (Microlab, México®), suero fetal bovino y antibióticos.

Incubación

Los embriones fueron incubados en McCoy®: 10 ml medio, 1 ml suero fetal bovino, y 20 μl de antibióticos, sobre filtros transparentes millicell-cm® de $0.4\mu\text{m}$. Se colocaron en una caja de plástico con 6 pozos, tres embriones por pozo debidamente identificado con 500 μl de medio de cultivo previamente preparado a una temperatura de 37°C , 60% de humedad y 5% de CO_2 . Se monitoreo la morfología y el grado de desarrollo durante 24 horas por medio de fotografías a los 30 minutos, 1 hora y después cada 2 horas hasta las 24 horas. Durante el cultivo, cuatro embriones de cada clasificación fueron retirados primero a las 4

horas, cuatro más a las 12 horas y los restantes hasta las 24 horas para ser procesados por la técnica de TUNEL (Roche Diagnostics Kit, Indianápolis, IN, USA), y determinar el grado de muerte celular (apoptosis).

TUNEL

Los embriones fueron fijados en paraformaldehído al 4% (Aldrich Chemicals Company Inc., USA) en PBS, pH 7.4 durante 30 minutos, después se lavaron 2 veces en PBS por 5 minutos, y después en solución de Triton X-100 al 0.1% (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) en PBS por 5 minutos a 4°C, después se lavaron en PBS por 5 minutos, al término se incubaron durante 1 hora a 37° C con 200 µl de solución de TUNEL (Fluoresceína-Dutp y dinucleotidil transferasa tdt). De esta manera, es posible detectar la fragmentación de las cadenas de DNA marcando el extremo 3'-OH utilizando un nucleótido marcado (fluoresceína-dUTP), mientras que la enzima tdt realiza la transferencia de los nucleótidos. Esta transferencia es analizada con microscopio confocal LSM 5 pascal, Zeiss (Argon-Krypton laser), con filtro BP 450-490.

6.3 Análisis estadístico

El análisis de los resultados obtenidos se hizo por medio de estadística descriptiva. Se calcularon los porcentajes de desarrollo, morfología y desechos celulares en las tres categorías. Además, se realizó un Análisis de Varianza para comparar el desarrollo de los embriones durante un periodo de 12 horas. En el caso del número de núcleos apoptóticos en las tres categorías también se realizó un Análisis de Varianza, seguido por comparación de medias a través de la prueba de Duncan, en ambos análisis se consideró un nivel de confianza del 95%.

VII. Resultados

7.1 Respuesta superovulatoria

Sesenta y cinco embriones fueron evaluados y clasificados de acuerdo a los criterios establecidos, de estos se seleccionaron 45 embriones para ser utilizados en el cultivo, quince embriones por cada categoría. (Figura.1.)

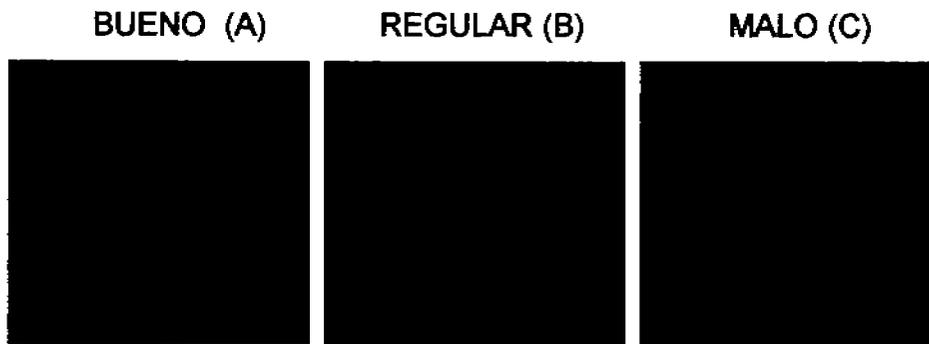


Fig.1. Microscopía de luz en embriones bovinos de las tres clasificaciones a 30 min del cultivo. A: Embrión de buena calidad: Esférico con buena simetría, masa celular bien definida, sin defectos en la zona pelúcida. B: Embrión de regular calidad: mayor espacio entre los blastómeros, color más oscuro. C: Embrión de mala calidad: blastómeros degenerados, abundantes desechos celulares.

7.2 Evaluación de los embriones

Se realizó una evaluación de la clasificación en los 45 embriones a las 4 horas de cultivo en donde se encontró que el 80 % de los embriones clasificados como buenos presentaron características que concuerdan con los criterios establecidos, como blastómeros compactos, color ámbar, sin vesículas evidentes y sin daños en la zona pelúcida, mientras el 20 % restante presentó características de embriones de regular calidad, como forma irregular en los blastómeros, algunos espacios y detritus celulares. En cuanto a los embriones regulares, 74 % presentó características de acuerdo a su clasificación original, como blastómeros más separados, con mayor espacio entre ellos, pero sin alteraciones en la zona pelúcida, mientras que 20 % mostró una morfología que

coincidía con mayor analogía a la clasificación de embriones buenos, y el 6 % restante se observaron con retraso en su desarrollo, mayor cantidad de detritus celulares y un color oscuro. Para los embriones clasificados como de mala calidad el 80% mostró características acordes con esa clasificación, como son una marcada degeneración, abundantes detritus celulares, y en algunos casos fractura de la zona pelúcida, en tanto que el 20 % restante manifestó similitud a embriones de regular calidad, como mejor cohesión entre blastómeros y ningún defecto en la zona pelúcida. (Figura. 2.)

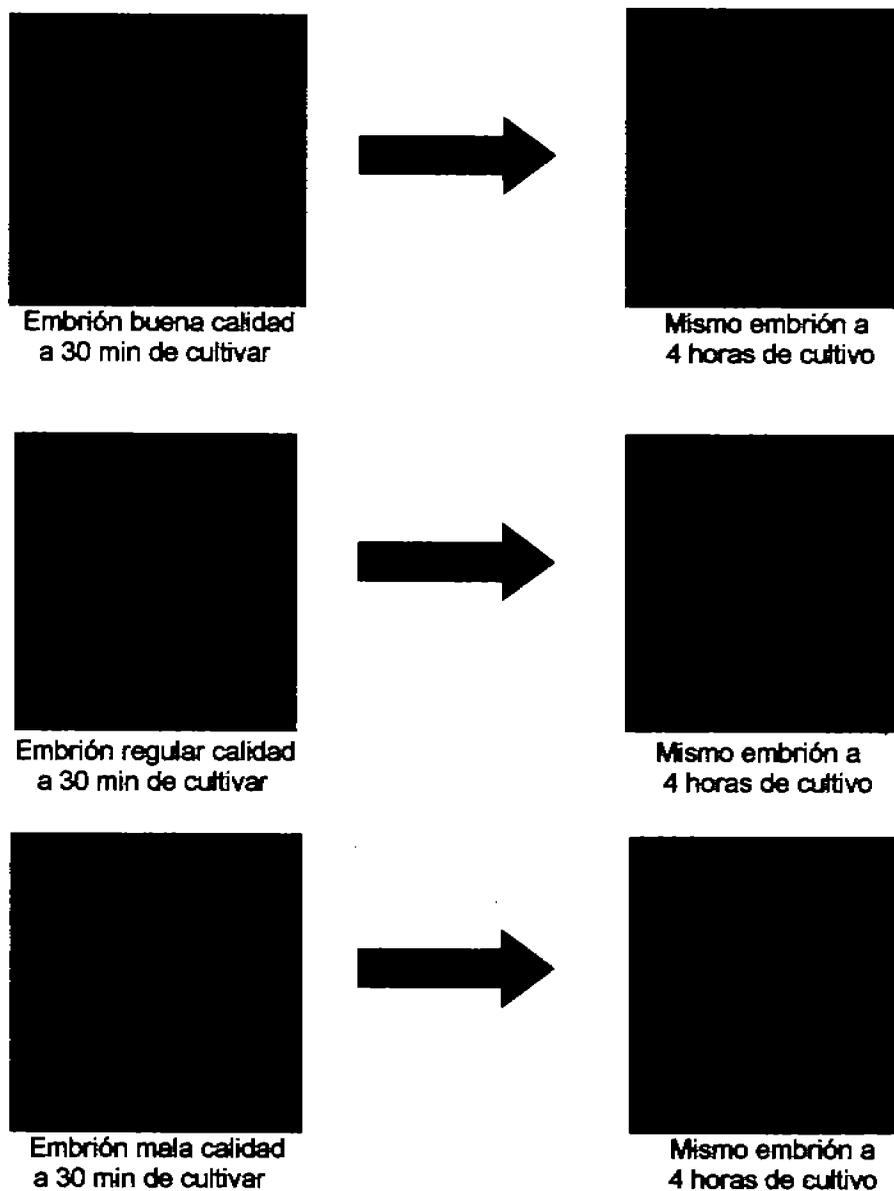


Fig. 2. Embriones de las tres clasificaciones, fotografías de la izquierda a 30 minutos del cultivo, fotografías de la derecha, 4 horas después de cultivo.

7.3 Evaluación durante el cultivo

Durante el cultivo se evaluó el desarrollo de 4 embriones de cada clasificación durante 12 horas, encontrando que los embriones de buena y regular calidad no sufrieron cambios en su estructura y continuaron de manera favorable con su desarrollo hasta 8 horas después de permanecer en el cultivo, mientras que los de mala calidad en tan sólo 2 horas presentaron cambios indicativos de degeneración y a partir de la cuarta hora no mostraron ningún cambio favorable en su desarrollo. (Cuadro.1.)

| DESARROLLO EN EL CULTIVO | TIEMPO | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| | 0 M | 30M | 1H | 2H | 3H | 4H | 5H | 6H | 7H | 8H | 9H | 10H | 11H | 12H |
| % | | | | | | | | | | | | | | |
| BUENOS | 100 | | | 75 | | | | | | 50 | | | | |
| REGULARES | 100 | | | 75 | | | | 50 | | | 25 | | | |
| MALOS | 100 | 75 | | 50 | | 25 | | | | | | | | |

Cuadro. 1. Se muestra el desarrollo de 4 embriones de cada clasificación durante 12 horas en el cultivo, al finalizar este periodo 50 % de los embriones de buena calidad continuaban con su desarrollo, mientras que tan sólo el 25 % de los regulares y malos mostraban características de un desarrollo favorable.

De igual manera se calcularon los porcentajes de desarrollo en los 7 embriones de cada categoría, que fueron cultivados por 24 horas. Los embriones buenos y regulares mantuvieron un desarrollo favorable más allá de 18 horas de iniciado el cultivo, mientras que los embriones de mala calidad no mostraron indicios de un buen desarrollo. Al evaluar el desarrollo en las tres diferentes clasificaciones se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los embriones clasificados como malos con respecto a los buenos y regulares.

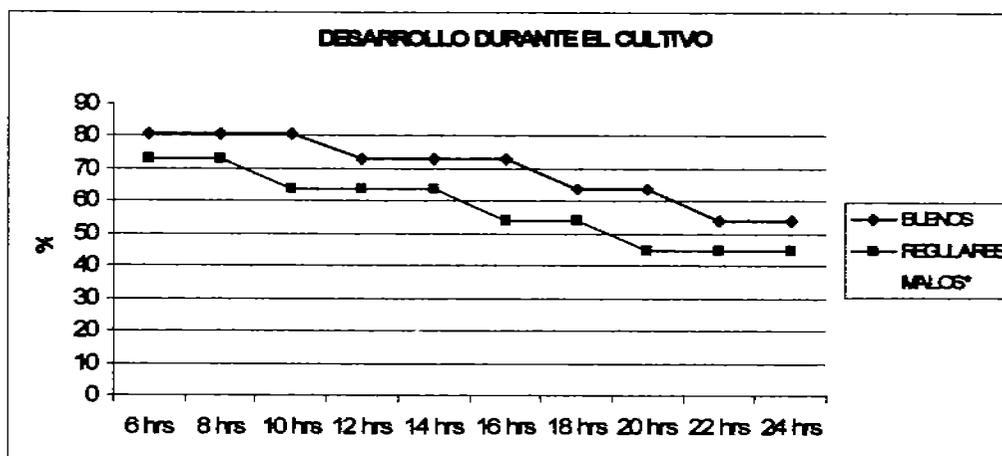


Fig. 3 La gráfica muestra la evaluación expresada en porcentaje del desarrollo de los embriones durante las 24 horas que estuvieron en el medio de cultivo. Se encontró diferencia estadística de los embriones malos con respecto a los buenos y regulares ($P < 0.05$).

7.4 Evaluación de la morfología en los embriones

En cuanto a la morfología de los embriones, se calcularon los porcentajes de las alteraciones para las tres clasificaciones, encontrando que los blastómeros en embriones buenos durante las primeras 4 horas de cultivo mantuvieron una buena cohesión entre ellos, posteriormente, el 30 % presentaron algunas irregularidades como la presencia de desechos celulares y algunos gránulos blancos. Después de diez horas de cultivo esto aumentó hasta 50 %, y para las 24 horas de cultivo el 70 % presentó alguna de estas características. En el caso de los embriones regulares, desde un principio el 20 % mostró algún defecto, como mayor oscurecimiento o algunos espacios entre blastómeros, esto fue aumentando gradualmente en la cantidad de desechos celulares, e irregularidades hasta concluir a las 24 horas con un 80 %. Por último, el 50% de los embriones malos presentaron alguna o todas las alteraciones antes mencionadas desde el comienzo del cultivo, llegando a 75 % después de cinco horas y terminando con un 90 % a las 24 horas de cultivo. (Cuadro.2.)

| MORFOLOGÍA | TIEMPO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|--------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|--|----|--|----|--|----|--|----|--|
| | 0 M | 30M | 1H | 2H | 3H | 4H | 5H | 6H | 7H | 8H | 9H | 10H | 11H | 12H | 13H | 14H | 15H | 24H | | | | | | | | | | |
| BUENOS | 100 | | | | 70 | | | | 30 | | | | 50 | | | | 50 | | 30 | | 70 | | | | | | | |
| REGULARES | 80 | | 20 | | 65 | | | | 35 | | | | 45 | | | | 55 | | | | 30 | | 70 | | 20 | | 80 | |
| MALOS | 50 | | | | 50 | | | | 25 | | | | 75 | | | | 10 | | | | 90 | | | | | | | |

Cuadro. 2. El cuadro muestra los cambios en la morfología de los embriones durante las 24 horas de cultivo.

De igual manera, se cuantificó en porcentaje la cantidad de desechos celulares, destacando que las tres clasificaciones mostraron en mayor o menor medida la presencia de material de desecho, en el caso de los embriones buenos, desde el inicio hasta finalizar el cultivo fue de 10 al 36 %, lo que se considera prácticamente normal, debido a que los embriones son organismos vivos que tienen actividad metabólica, aun cuando estén en un medio artificial. En tanto que para los embriones regulares, comenzaron con un 18 % al inicio del cultivo y terminaron con un 54 %, esto concuerda con las características de los mismos, sin embargo es hasta después de 8 horas dentro del medio de cultivo que el porcentaje de desechos llega al 36%, lo que indica que estos embriones lo toleran sin sufrir alteraciones significativas que pongan de manifiesto una considerable degeneración. Para el caso de los embriones malos, cabe destacar que en el inicio del cultivo sólo contaban con 27 % de desechos celulares, pero el incremento fue gradual hasta llegar al 70 %, al concluir con las 24 horas del cultivo, lo que indica un limitado potencial de desarrollo. (Cuadro. 3.)

| DESECHOS CELULARES | TIEMPO | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 M | 30M | 1H | 2H | 3H | 4H | 5H | 6H | 7H | 8H | 9H | 10H | 11H | 12H | 13H | 14H | 15H | 24H |
| BUENOS | 10 | | | 18 | | | 27 | | | 36 | | | 36 | | | | | |
| REGULARES | 18 | | 27 | | 36 | | 45 | | 54 | | 54 | | | | | | | |
| MALOS | 27 | | 36 | | 45 | | 54 | | 70 | | | | | | | | | |

Cuadro.3. El cuadro muestra la cantidad de desechos celulares durante el cultivo. Todos los embriones mostraron cierta cantidad de desechos celulares y esta fue aumentando gradualmente de acuerdo a su clasificación.

7.5 Grado de apoptosis

En cuanto al grado de apoptosis, en todos los embriones se detectaron células TUNEL-positivo, el incremento fue gradual para las tres clasificaciones. En los embriones que fueron separados a las 4 horas del cultivo, embriones de buena calidad mostraron un promedio de 15.4 ± 2 células apoptóticas, mientras que los de regular calidad tuvieron en promedio 18.5 ± 3 y los embriones de mala calidad presentaron un promedio de 25.3 ± 1 encontrando diferencia estadística entre los embriones malos con respecto a los buenos y regulares ($P < 0.05$). En la evaluación que se realizó en los embriones a las 12 horas, los de buena calidad mostraron 17.6 ± 1.5 células apoptóticas, en tanto que los regulares tuvieron 21.4 ± 3 y los clasificados como de mala calidad presentaron 27.0 ± 1 , encontrando diferencia estadística entre los tres grupos ($P < 0.05$). Por último el grado de apoptosis en los embriones a las 24 horas fue de 20.6 ± 2 para los embriones buenos, 25.4 ± 3 en los regulares y 29.2 ± 1 en los malos, encontrando diferencia estadística entre los embriones buenos con respecto a los regulares y malos ($P < 0.05$). (Figura. 4.)

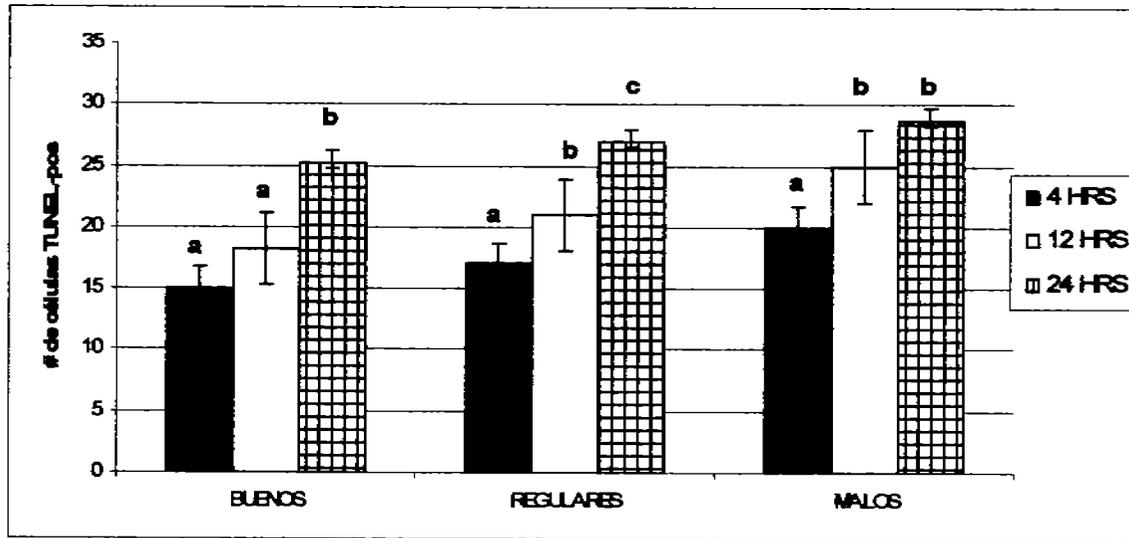


Figura. 4. La gráfica muestra el promedio de células apoptóticas en cada una de las clasificaciones, a las 4, 12 y 24 horas de cultivo ($P < 0.05$).

La evaluación realizada con microscopio confocal permite demostrar que los embriones de las tres clasificaciones a las 24 horas de cultivo, presentan un mayor número de células con proceso de apoptosis en los embriones de regular y mala calidad, en los tres casos se presentan las fotografías en campo oscuro con fluorescencia y con luz, para en contraste poder observar la zona pelúcida. (Figura.5.)

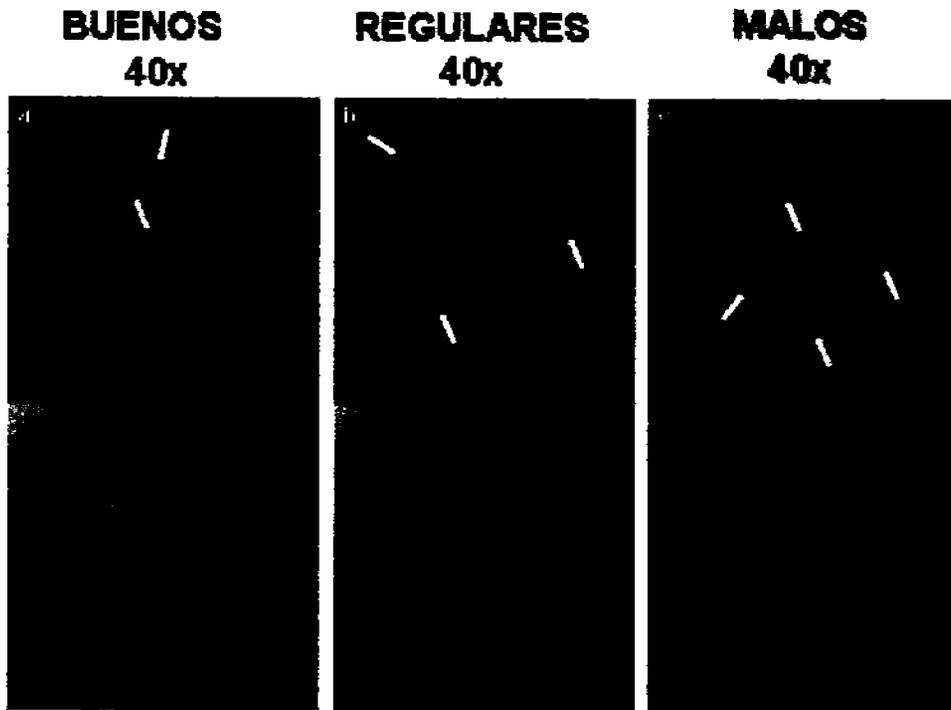


Fig. 5. Evaluación por medio de la técnica de TUNEL. Embriones de las tres clasificaciones a las 24 horas de cultivo, (a) (b) (c), las flechas indican las células apoptóticas, (d) (e) (f) ilustra el mismo embrión que la fotografía superior, con microscopia de luz en la que se puede observar la zona pelúcida.

VIII. Discusión

En general la evaluación de la calidad de los embriones al ser descongelados coinciden con los resultados de Márquez (2003) y Shea (1981), quienes reportaron que embriones de buena calidad presentan una forma esférica, color ámbar y sin alteraciones de la zona pelúcida, los regulares presentan algunas imperfecciones en la zona pelúcida, además de detritus celulares y algunos blastómeros con forma irregular, en tanto que los malos poseen mayor cantidad de desechos celulares y un número más alto de blastómeros irregulares y en degeneración. Asimismo se encontró semejanza en la evaluación observada por Albiñ *et al.*, (1990), quienes determinaron que en un blastocisto de buena calidad hay una clara diferenciación entre las células trofoblásticas, células de la masa celular interna y formación del blastocele. Por otra parte Shamsudin y Rodríguez-Martínez (1994), han descrito en embriones regulares, blastómeros con espacios donde no se observa ningún elemento celular y menor número de uniones entre los blastómeros, y en el caso de los embriones de mala calidad, estos presentaron características específicas como blastómeros poco delimitados, mayor cantidad de desechos celulares y en algunos se pudo observar fractura en la zona pelúcida.

En cuanto a la evaluación que se realizó en todos los embriones a las 4 horas de ser cultivados, los resultados concuerdan con lo reportado por Aguilar *et al.*, (2002) quienes demuestran hasta un 30% de variabilidad en los criterios de evaluación, en el caso de este trabajo la variación fue encontrada por arriba del 20%, siendo menor, pero aun denotando la subjetividad de la evaluación por medio de microscopia estereoscópica y de la misma forma se confirma lo mencionado por Farin *et al.*, (1985) acerca de que no hay constancia entre evaluadores para la correcta clasificación de los embriones, lo anterior sugiere que los embriones producidos de forma rutinaria tienen cierto grado de error en cuanto a su evaluación, quedando claro que efectivamente en la actualidad se

carece de algún método para evaluar y clasificar los embriones de manera precisa, objetiva y no invasiva para conocer la viabilidad de los embriones.

Al finalizar el cultivo se encontró que los embriones tuvieron buena adaptación al medio mostrando un grado de desarrollo en el que los embriones de buena y regular calidad pasaron de la etapa que se encontraban hacia una más avanzada, resultados que concuerdan con Jousan *et al.*, (2004) en donde destacan que el uso de un sistema de cultivo puede propiciar el buen desarrollo de los embriones, sin embargo los de mala calidad sólo tuvieron un 25% de desarrollo con lo que quedó demostrado que las posibilidades de estos para lograr tener éxito al transferirlos son casi nulas. Lo anterior sugiere que el cultivo de embriones es una prueba que permite diferenciar entre embriones que han sido clasificados en principio como buenos y que en realidad no lo mostraron durante el periodo de cultivo, o en el caso de algunos embriones de calidad regular, de los cuales el 50 % mostró un buen desarrollo, llegando a ser similar al de los clasificados como de buena calidad, y en el caso de los embriones de mala calidad se confirma que su capacidad para continuar con su desarrollo es limitada y que en tan solo un periodo de 2 a 4 horas se pueden apreciar cambios indicativos de una clara degeneración.

Asimismo cabe destacar que las condiciones del medio de cultivo fueron propicias para que los embriones continuaran con su desarrollo durante el periodo establecido de cultivo, resultados que pueden compararse con los encontrados por Lonergan *et al.*, (2003), en los que realizaron cultivos por diferentes periodos, mostrando una supervivencia del 100 % a las 24 horas de cultivo. En el mismo estudio concluyen que las condiciones de cultivo tienen un marcado efecto sobre la calidad de los blastocistos y, que los embriones bovinos presentan una clara sensibilidad al ambiente que proporciona el cultivo en determinado periodo provocando algunas alteraciones en el desarrollo. Asimismo, se produce una menor tolerancia en el proceso de congelamiento, por lo que al menos bajo las condiciones de este experimento el medio de cultivo

utilizado no tuvo efectos negativos sobre los embriones dentro de las 24 horas establecidas para su evaluación. De igual forma queda demostrado que la técnica de cultivo puede ser utilizada como una prueba diagnóstica para la evaluación de embriones descongelados por medio de la cual se obtendrá mayor información sobre su estado actual aumentando de esta manera el control que se tiene sobre embriones que pudieron ser producidos y congelados en condiciones distintas, pero en los que en ocasiones no se tiene conocimiento de la procedencia de los embriones o durante cuanto tiempo han permanecido almacenados y bajo que condiciones. En tanto que en el caso de embriones frescos el cultivo se podría implementar como una prueba en campo para evaluar a los que no presenten características que lo hagan ser clasificado como embrión de buena calidad, y que al ser regulares o malos solamente podrán ser sujetos de una transferencia el mismo día de la recolección pero con menores expectativas acerca de las probabilidades de que logre una gestación, de esta manera si se implementara el cultivo de los embriones por unas horas se podría evaluar si es que éstos continúan con su desarrollo y determinar si son viables para realizar la transferencia.

Autores como Pereira et al., (2005) y Brandao et al., (2004) han evaluado sistemas de cultivo en embriones a diferentes etapas de desarrollo, así como el prolongar el tiempo de cultivo hasta etapas posteriores a la eclosión, en ambos casos se ha evaluado el potencial de los embriones para soportar las condiciones del medio de cultivo y se ha demostrado que éstos poseen la capacidad de desarrollarse, de igual manera los embriones han llegado hasta etapas en las que da inicio la diferenciación de varios linajes celulares. De hecho la mayoría de los autores mencionados realizan evaluaciones en el desarrollo embrionario de organismos provenientes de producción *in vitro* debido a que no han logrado mantener estándares adecuados en el desarrollo de los embriones. Sin embargo en la mayoría de las ocasiones los embriones *in vivo* tienen una mayor capacidad para desarrollarse y soportar las condiciones de diversos medios de cultivo. El desempeño de los embriones que tuvieron un origen,

maduración, fertilización y desarrollo *in vitro* no ha logrado rebasar a los embriones producidos de manera natural por medio de un protocolo de superovulación e inseminación artificial. (Pomar *et al.*, 2005, Gjorret *et al.*, 2003).

En lo referente al uso de embriones previamente congelados, cabe mencionar que a pesar de que estos sufren daños debido al proceso de congelación y descongelación (Dobrinsky 1996), en el presente estudio su desarrollo en el medio de cultivo mostró características similares a los embriones que no han sufrido este proceso en cuanto a su morfología (Aguilar *et al.*, 2002), de esta forma se demuestra que el cultivo puede ser empleado en embriones que han permanecido congelados. De igual manera se sugiere que si la prueba se utiliza en el caso de embriones en fresco, estos tendrían una mayor oportunidad de demostrar por completo su potencial ya que no han pasado por el proceso de congelación y descongelación.

En cuanto a la evaluación realizada al término del cultivo por medio de la técnica de Tunel, se encontraron células Tunel-positivo en todos los embriones, estos resultados concuerdan con los reportados por Márquez *et al.*, (2004) y Gjorret *et al.*, (2003) en el que detectaron células Tunel positivo en los embriones evaluados aún en diferentes etapas de desarrollo. Es sabido que el proceso de apoptosis ocurre de manera natural siendo parte mismo del desarrollo y que esta mediado por la maquinaria genética. En el presente estudio se observó que embriones clasificados como buenos presentaron un menor número de células Tunel-positivo ($P < 0.05$) que los regulares y los malos, lo cual concuerda con el desarrollo que tuvieron durante el tiempo de cultivo, sin embargo el 20 % de los embriones clasificados como de regular calidad presentaron un grado de desarrollo similar al de los buenos, logrando pasar de la etapa en que se encontraban al inicio del cultivo hacia una más avanzada, lo cual sugiere que embriones que de manera comercial no son congelados y tan sólo se transfieren en fresco, podrían ser evaluados por medio del cultivo y así tener una alternativa en la que se tenga la posibilidad de evaluar y clasificar los embriones de acuerdo

a su desempeño durante el cultivo en un periodo corto de tiempo y de esta forma la clasificación no solo se base en la evaluación que se otorga por medio del microscopio estereoscópico, la cual ha demostrado cierto grado de subjetividad. En cuanto al incremento gradual de células Tunel-positivo en las tres clasificaciones de embriones los resultados reportados por Gjorret *et al.*,(2003), mencionan que los producidos *in vitro* presentan un mayor grado de apoptosis en las células de la masa celular interna que los de origen *in vivo*, así en los resultados obtenidos durante el presente trabajo la distribución de las células apoptóticas fue similar encontrando un mayor número en la masa celular interna, sin embargo en los embriones de mala calidad la distribución fue homogénea para todo el embrión.

Es posible concluir que el someter a los embriones a un medio de cultivo podría ser una herramienta útil tanto en el diagnóstico de la calidad del embrión al momento de la recolección, como un método que permita evaluar la viabilidad de embriones almacenados en nitrógeno líquido.

IX. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el cultivo de embriones es favorable, ya que estos se adaptaron al medio de cultivo, tolerando el periodo establecido, continuando con su desarrollo y mostrando características que denotan la viabilidad de los mismos en tan sólo un lapso de 4 a 6 horas.

Aún cuando en el presente trabajo los embriones evaluados se mantuvieron almacenados en nitrógeno líquido por un periodo de 5 meses, se mostró que el cultivo puede ser utilizado como un filtro en aquellos embriones que se desconozca por completo su procedencia o no se tenga un buen registro de las condiciones y tiempo de almacenamiento, ya que el realizar transferencia de embriones sin conocimiento del estado de los embriones, implica, en el caso de no tener el éxito esperado la desmotivación por parte de los productores, así como un mayor desconocimiento de cual fue la verdadera causa por la que no se tuvo éxito.

Por lo anterior se puede sugerir que el cultivo de embriones sea utilizado como una prueba diagnóstica en la que se evalúen los embriones antes de ser transferidos, y hacer un seguimiento posterior a la transferencia de los embriones que sean seleccionados como viables, para conocer si se logra incrementar la fertilidad y de esta forma ayudar a mejorar la técnica de transferencia de embriones.

También se recomienda realizar otros estudios en los que puedan evaluarse un mayor número de embriones, así como explorar la posibilidad de llevar este tipo de prueba a condiciones de campo en donde se realicen cultivos de embriones frescos recolectados *in situ*, para evaluar el comportamiento de los mismos y ayudar de esta forma a la toma de decisiones en cuanto a que embriones deben ser transferidos o no, así como a poder realizar una mejor selección de los embriones por congelar.

X. Literatura citada

1. Aguilar M, Galina C, Merchant H, Montiel F, Canseco R, Márquez YC. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod Dom Anim*, 2002, 37:1-6
2. Albiñ A, Rodríguez-Martínez H, Gustafsson H. Morphology of day 7 bovine demi-embryo during in vitro reorganization. *Acta Anatomical*, 1990, 138: 42-49
3. Baguisi A, Lonergan P, Overstrom E, Boland M. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology*, 2000, 55:162
4. Barros CM and Nogueira MFG. Embryo Transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 2001, 56:1463-1496
5. Bastidas P, Randel R. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology*, 1987, 28: 531-541
6. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos facts and artifacts. *Hum Reprod*, 1995, 1:91-148
7. Betts D and King W. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*, 2001, 55:171-191
8. Brandao DO, Maddox-Hyttel P, Lovendahl P, Rumpf R, Stringfellow D, Callensen H. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. *Biol Reprod*, 2004, 71: 2048:2055
9. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of the apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil*, 1999, 117: 97-105
10. Cunningham E. The genetic improvement of cattle in developing countries, 1989, 31:17-28
11. Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 1996, 45:17-26
12. Farin P, Britt J, Shaw D, Sleining B. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 1995, 44:339-350
13. Fouladi-Nashta AA, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell KH, Webb R. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in

- culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 2003, 126: 337-346
26. Madalena F, Teodoro R, Lemos J, Montiero Y, Barbosa T. Evaluation of strategies for crossbreeding of dairy cattle in Brazil. *J Dairy Science*, 1989, 73:1887-1901.
 27. Manjo G and Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995, 146:3-15
 28. Márquez-Alvarado YC. Utilización de la técnica de transferencia de embriones para evaluar la estacionalidad reproductiva en ganado cebú. (Tesis de Doctorado) FMVZ-UNAM, México. 2003.
 29. Márquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, León H, Moreno-Mendoza N. Evidence of Damage in Cryopreserved and Fresh Bovine Embryos Using the Tunel Technique. *Reprod Dom Anim*, 2004, 39:141-145
 30. Márquez YC, Galina CS, Moreno N, Ruiz H, Ruiz A, Merchant L. Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reprod Dom Anim*, 2005, 40: 553-558
 31. Massey J, and Oden A. No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Theriogenology*, 1984, 21:197-211
 32. Mastro Monaco GF, Semple E, Robert C, Rho GJ, Betts DH, King WA. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reprod Dom Anim*, 2004, 39: 462-467
 33. Matwee C, Betts DH, King WA, Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 2000, 8: 57-68.
 34. Mohr L, and Trounson A. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod*, 1981, 25:1009-1025
 35. Occhio M, Jillella D, Lindsey B. Factors that influence the recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure follicles to LH. *Theriogenology*. 1999, 51:9-35
 36. Overstrom EW. In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology*, 1996, 45:3-16
 37. Pereira DC, Dode MAN, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 2005, 63:1131-1141

38. Pomar RFJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguliar B, Roelen BAJ. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, 2005, 63: 2254-2268
39. Robertson I., Nelson RE. Certification and identification of the embryo. In: stringfellow DA, Seidel, SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy, IL. IETS, 1998, 103-134
40. Rondeau M, Guay P, Goff A, Cooke G. Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. *Theriogenology*. 1995, 44:351-366
41. Rutledge JJ. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology*, 2001, 55: 105-111
42. Schneider U and Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 1984, 21:68-79
43. Shamsuddin M, Rodríguez-Martínez H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *J Vet Med*, 1994, 41: 307-316
44. Shea B. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 1981, 15:31-35
45. Sommerfeld V and Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 1999, 38: 95-105
46. Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 1996, 45:27-40
47. Van Wagtendonk-De Leeuw AM, Den Daas JHG, Kruij THAM, Rall WF. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology*, 1995, 32:157-167
48. Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicácio AC, Assumpção MEOA. Cryopreservation of Bos taurus vs Bos indicus embryos: Are they really different?. *Theriogenology*, 2002, 57: 345-359