



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

**ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA CLASIFICACIÓN DE
EMBRIONES POR MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA Y
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN EN
GANADO *Bos taurus***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

EVA PATRICIA LÓPEZ DAMIÁN

TUTOR: DR. CARLOS SALVADOR GALINA HIDALGO
COMITÉ TUTORAL: DR. JAVIER DE JÉSUS VALENCIA MÉNDEZ
DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

MÉXICO, DF.

2007.



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos Salvador Galina Hidalgo y el trabajo de microscopía electrónica de transmisión en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM bajo la cotutoría del Dr. Horacio Merchant Larios.

El presente proyecto se realizó con el apoyo de:

- **El Rancho La Escondida en Aguascalientes particularmente al C. Ricardo Álvarez Jiménez, quien proporciono las vaquillas Holstein.**
- **La empresa Reproducción Animal SA., dirigida por el Dr. Remigio Espinosa por la donación de semen Brahman.**

Y fue financiado por

- **El Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT IN- 201903).**

Agradecimientos

Al Doctor Carlos Salvador Galina por la oportunidad que me dio, la orientación, paciencia y sobre todo por su confianza para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al Doctor Horacio Merchant Larios por permitirme realizar el presente proyecto en su laboratorio y por su asesoría en microscopía electrónica de transmisión para el análisis de los embriones bovinos.

Al Doctor Javier de Jesús Valencia Méndez por el apoyo bibliográfico y por la guía brindada durante el transcurso de este proyecto de maestría.

Al Doctor Remigio Espinosa por la autorización y donación de semen del toro Brahman.

Al Doctor Benjamín García Rodríguez por su ayuda con la obtención de los animales y apoyo con los mismos.

Al MVZ Marco Antonio Alarcón Zapata por su invaluable colaboración en el trabajo de superovulación.

Al Doctor Marco Asprón por su invaluable colaboración en la colección de embriones y clasificación por microscopía estereoscópica.

Al Doctor Carlos Cedillo por su invaluable apoyo en la interpretación histológica y ultraestructural de los embriones bovinos, así como por su ayuda en la revisión de la tesis.

Al Sr. José Guadalupe Baltasar García por el apoyo técnico brindado en la obtención de cortes finos para microscopía electrónica y asesoramiento para el procesamiento y corte semifinos de embriones para microscopía electrónica.

A la Doctora Norma Moreno Mendoza por el apoyo bibliográfico brindado y asesoría para la obtención de fotografías de embriones bovinos al microscopio de luz.

Al M en C José Alejandro Marmolejo Valencia por el apoyo técnico brindado en el manejo de embriones, revelado y obtención de micrografías electrónicas.

Al Doctor Jorge Ávila García y Dr. Olguín por sus valiosas sugerencias para la presentación y defensa del presente proyecto.

A los distinguidos miembros del jurado Dra. Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Miguel Ángel Cornejo, Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Javier Valencia Méndez y Dr. Carlos Salvador Galina Hidalgo por sus valiosas aportaciones para la elaboración de la tesis.

DECLARACIÓN

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario.

MVZ Eva Patricia López Damián

**Estudio comparativo sobre la clasificación de embriones por
microscopía estereoscópica y microscopía electrónica de
transmisión en ganado *Bos taurus***

CONTENIDO

I. Resumen.....	vii
II. Abstract.....	viii
III. Introducción.....	ix
IV. Revisión de literatura	
4.1 Clasificación embrionaria.....	12
4.2 Evaluación de calidad por microscopía estereoscópica.....	12
4.2.1 Morfología embrionaria.....	12
4.2.2 Parámetros morfológicos.....	16
4.2.3 Criterios de clasificación.....	17
4.2.4 Estados de desarrollo	19
4.3 Evaluación de calidad por microscopía electrónica.....	23
4.3.1 Características ultraestructurales de mórulas.....	23
4.3.2 Características ultraestructurales de blastocistos.....	24
4.3.3 Muerte celular.....	25

4.3.4	Importancia de algunas características ultraestructurales referentes a la calidad celular.....	27
4.3.5	Diferencias ultraestructurales entre especies.....	30
4.3.6	Criterios ultraestructurales de clasificación.....	31
4.4	Otras formas de evaluar la calidad embrionaria	35
4.4.1	Cultivo embrionario.....	36
4.4.2	Consumo de oxígeno.....	36
4.4.3	Actividad metabólica.....	37
4.4.4	Indicador de crecimiento (Alamarblue tm).....	38
4.5	Producción de interferón.....	39
4.5	Factores que afectan la calidad embrionaria	40
4.5.1	Evaluador.....	40
4.5.2	Razas.....	41
4.5.3	Edad de la donadora.....	45
4.5.4	Época del año.....	47
4.5.5	Calidad del ovocito.....	48

V. Objetivos.....	51
5.1 General	
5.2 Particular	
5.3 Hipótesis	
VI. Material y métodos.....	52
6.1 Fase de campo.....	52
6.2 Fase de laboratorio.....	53
6.3 Análisis estadístico.....	58
VII. Resultados.....	59
7.1 Respuesta superovulatoria.....	59
7.2 Evaluación de los embriones por microscopía estereoscópica.....	60
7.3 Evaluación de los embriones por microscopía de luz.....	60
7.4 Evaluación de embriones por microscopía electrónica de transmisión.....	68
7.5 Comparación entre las evaluaciones.....	69
7.6 Concordancia entre los métodos de evaluación	70
VIII. Discusión.....	80
IX. Literatura citada.....	86

Lista de cuadros

1. Esquema del tratamiento superovulatorio.....	53
2. Clasificación de embriones de acuerdo a su calidad y relación entre el número de cuerpos lúteos encontrados y número de embriones recuperados.....	59
3. Porcentajes de embriones en las diferentes calidades de acuerdo a los diferentes métodos de clasificación.....	67

Lista de figuras

1. Microfotografía de una mórula al Mest.....	14
2. Microfotografía del corte semifino de una mórula al ML.....	14
3. Morfometría de un embrión.....	15
4. Código numérico de los estados de desarrollo asignados por la IETS.....	22
5. Fotografías de embriones al MEst.....	62
6. Corte semifino de un blastocisto clasificado como calidad 1 por MEst.....	63
7. Corte semifino de una mórula clasificada como calidad 3 por ML.....	64
8. Corte semifino de una mórula clasificada como calidad 2 por ML.....	65
9. Corte semifino de una mórula clasificada como calidad 3 por ML.....	66
10. Se muestra la forma en que ocurrieron los cambios de calidad por embrión y método utilizado.....	67

11. Microfotografía electrónica de un blastocisto clasificado como calidad 1.....	71
12. Microfotografía electrónica de células del TF en un embrión calidad 1.....	72
13. Microfotografía electrónica del acercamiento de un complejo de unión entre células del TF.....	72
14. Microfotografía electrónica de un blastocisto calidad1.....	73
15. Diferentes tipos de mitocondrias.....	74
16. Microfotografía electrónica de un embrión de calidad 2 en la cual se observan gotas lipídicas y detritus celulares.....	75
17. Microfotografía electrónica de un fagosoma.....	76
18. Microfotografía electrónica de un embrión calidad 3.....	77
19. Blastocisto de buena calidad tanto por microscopía estereoscópica como por microscopía electrónica de transmisión.....	78
20. Mórula clasificada como calidad 2 por microscopía estereoscópica y calidad 1 por microscopía electrónica de transmisión.....	79

Abreviaturas utilizadas

- BE: blastómero extruído.
- CT: células del trofoblasto.
- CL: cuerpo lúteo.
- CG: células de la granulosa
- EP: espacio perivitelino.
- IA: inseminación artificial.
- IETS: International Embryo Transfer Society o Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
- MCC: masa compacta de células.
- MCI: masa celular interna.
- MEst: microscopía estereoscópica.
- MET: microscopía electrónica de transmisión.
- ML: microscopía de luz.
- TE: transferencia de embriones.
- ZP: zona pelúcida.
- SM: stereoscopic microscopy
- ETM: electronic transmission microscopy

I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar si los criterios de clasificación por microscopía estereoscópica son eficientes para embriones de ganado *Bos taurus* al ser comparados con los criterios empleados por microscopía electrónica de transmisión, ya que en *Bos indicus* se ha demostrado que los criterios no son eficientes. Diez vaquillas de la raza Holstein fueron sometidas a un programa de sincronización y superovulación, inseminándolas artificialmente a las 12 y 24 horas después de iniciado el celo, realizándose la recolección de embriones a los 7 días. Se colectaron sesenta embriones, los cuales fueron clasificados y seleccionados mediante microscopía estereoscópica (MEst) con base en los criterios de calidad establecidos por la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, por sus siglas en inglés) distribuyendo para el estudio 10 embriones en cada calidad (buenos, regulares y malos). Los cortes semifinos y finos fueron observados para clasificar a los embriones procesados. Los resultados fueron analizados utilizando estadística descriptiva y para medir la concordancia que existía entre ellos se utilizó la prueba de Kappa de Cohen. Al realizar las evaluaciones de los embriones clasificados como buenos por Mest se observó que por MET aumentaron de 33 a 47%, mientras que los regulares bajaron de 33 a 20% y los malos no mostraron cambios. Con respecto al grado de concordancia entre los métodos de evaluación se determinó que esta es moderada. Estos hallazgos muestran que la calidad en la que se observa deficiencia en los criterios de clasificación es la regular ya que las otras dos calidades son asignadas exitosamente. En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran como los criterios de clasificación propuestos por Robertson y Nelson (1998) en el Manual de La Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria para *Bos taurus* son eficientes.

Palabras clave: *Bos taurus*, calidad embrionaria, evaluación morfológica, microscopía electrónica de transmisión, microscopía estereoscópica.

II. Abstract

The objective of the following work was to determine if the criteria of classification using stereoscopic microscopy is efficient for embryos produced from *Bos taurus* as the technique in *Bos indicus* has shown to be not very efficient. Ten Holstein heifers were superovulated and inseminated at 12 and 24 hours after the onset of estrus. Seven days later, sixty embryos were collected and were classified by stereoscopic microscopy (SM) based on the quality criteria established by the IETS, and distributed ten embryos in each quality (good, fair and poor).

Later the semithin and ultrathin sections were watched to classify the embryos already processed. The results were analyzed using descriptive statistics and to quantify the agreement between the two methods of classification the test of Kappa de Cohen was used. Embryos classified as good by SM it was observed that when evaluated by ETM values varied from 33 to 47 %, whereas in embryos classified as fair corresponding values were 33 to 20 %. No changes were observed in poor quality embryos. With regard to the degree of agreement between evaluation it was determined that this is moderate. These findings show that the main quality in which there is discrepancy is the embryos classified as fair. The other two categories were similar in the evaluation using either ETM or SM.

In conclusion, the results of the present work show that the criteria of classification proposed by Robertson and Nelson (1998) in the International Embryo Transfer Society Manual (IETS) for *Bos taurus* is efficient.

Key words: *Bos taurus*, embryonic quality, morphological evaluation, electron microscopy, stereoscopic microscopy.

III. INTRODUCCIÓN

En la ganadería bovina a través de los años se ha tratado de mejorar genéticamente a los animales con la finalidad de aumentar la cantidad y calidad de su producción (Butler y Biggers 1989). Para ello, se han implementado estrategias reproductivas, como es la inseminación artificial (IA), método por el cual se acelera el mejoramiento del hato comparado con la tradicional monta natural. Sin embargo el progreso genético tardaría por lo menos de 6 a 7 años (Seidel 1981), por lo que la transferencia embrionaria (TE) sería la mejor opción después de la IA (Lohuis 1995). Al respecto, Christensen (1991) señala que con la TE se logra un incremento genético del 50%.

La primera transferencia embrionaria la llevó a cabo Heape en 1891, en conejos, pero tuvo que transcurrir aproximadamente un siglo para que se volviera a utilizar y se desarrollara hasta convertirse en una herramienta de mejoramiento genético. Betteridge (1981) en una amplia revisión sobre el tema describe que en 1951 se informó del primer éxito de TE en bovinos, sin embargo no fue hasta los años 70's cuando esta tecnología crece y experimenta un auge comercial, principalmente para el ganado Holstein (Hasler 2006).

La TE ha sido mayormente adoptada para el ganado *Bos taurus*. Esto probablemente se deba a que la fertilidad de este tipo de ganado es mayor que la del *Bos indicus*. Los porcentajes de preñez que presenta *Bos indicus* oscilan entre el 32 a 50% (Montiel *et al* 2006, Donaldson 1984, Halley *et al* 1979, Nogueira *et al* 2002) mientras que en el *Bos taurus* es de 60 a 70% con embriones transferidos en fresco (Wright 1981, Spell *et al* 2001, Chartrain y Picard 1988, Hasler 1992). En ambos biotipos, los porcentajes de preñez disminuyen un 10% cuando los embriones transferidos fueron congelados (Niemann 1991, Dobrinsky 2002, Spell *et al* 2001, Hasler 1992, Godking *et al* 1987). Lo anterior sugiere que los resultados de la TE en el ganado de tipo *Bos*

taurus son mas altos independientemente de que los embriones transferidos sean frescos o criopreservados.

Otra diferencia consiste en que el número de embriones transferibles (buena calidad) obtenidos por donadora es menor en *Bos indicus* entre 3 y 7 (Donaldson 1984, López *et al* 1995, Halley *et al* 1979, Aguilar *et al* 2002, Neto *et al* 2004, Márquez *et al* 2005) que en *Bos taurus*, de 5 a 7 (Hasler *et al* 1983, Barrios *et al* 1982, Hasler 1992, Neto *et al* 2004). De manera que en *Bos taurus* generalmente se obtiene un mayor número de embriones y de mejor calidad.

Por otra parte Cutini *et al* (2000) indican que la calidad embrionaria influye en los resultados de la TE, lo que sugiere que los embriones *Bos taurus* son de mejor calidad que *Bos indicus*.

Sin embargo, lo anterior no ha sido esclarecido debido a la imprecisión que existe para asignar la calidad embrionaria. Farin *et al* (1995) demostraron que la calidad asignada no es siempre la que le corresponde al embrión, existiendo un rango de error de 32%. De la misma manera Van Somm *et al* (1996) y De Leew (1996) demostraron que la concordancia que existe entre evaluadores es pobre, lo que sugiere que la clasificación embrionaria es un método inexacto para la evaluación de la calidad.

Por otro lado, Aguilar *et al* (2002) demostraron que la calidad asignada a embriones *Bos indicus* es imprecisa ya que del 51% de embriones clasificados como de buena calidad por microscopía estereoscópica al ser evaluados por microscopía electrónica de transmisión determinaron que solo el 24% de ellos pertenecían a dicha calidad, así mismo se observó un aumento en los embriones clasificados como regulares y malos pasando de 24% a 29% y de 22 a 31% respectivamente. Estos resultados sugieren que los embriones no siempre son clasificados correctamente en cuanto a su calidad y que los

criterios de clasificación pueden ser imprecisos para el ganado cebú. Por lo tanto, si se evaluaran correctamente los porcentajes de preñez, probablemente aumentarían.

Cabe señalar que los criterios de clasificación empleados fueron establecidos principalmente para el ganado Holstein por lo que existe la posibilidad de que la inexactitud encontrada en la clasificación de embriones cebú no sea adecuada en embriones *Bos taurus*, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la clasificación embrionaria del ganado *Bos taurus* por medio de microscopía estereoscópica confirmando resultados por microscopía electrónica de transmisión.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA

La transferencia embrionaria cuenta con diversas herramientas que ayudan a que se desarrolle satisfactoriamente, tal es el caso de la clasificación embrionaria, la cual ayuda a la selección de los embriones asignándoles un nivel de calidad (buenos, regulares o malos) basado en parámetros morfológicos y estado de desarrollo (Overström 1996) los cuales son evaluados por medio del microscopio estereoscópico.

La importancia de la evaluación de la calidad embrionaria es que se ha visto correlacionada positivamente con el éxito de la transferencia. Los porcentajes de gestación que se alcanzan al transferir embriones calidad 1 es de 60%, mientras que con los de mala calidad solamente es el 27% (Tervit *et al* 1980, Wright 1981, Lindner y Wright 1983, Hasler *et al* 1987, Godking *et al* 1987 y López *et al* 1995, Cutini *et al* 2000). Sin embargo, aunque este parámetro ha sido usado para predecir el porcentaje de preñez existen limitaciones para determinar la viabilidad del embrión.

4.2 EVALUACIÓN DE CALIDAD POR MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA

La asignación de la calidad embrionaria se basa en criterios de clasificación cuya aplicación implica el conocimiento de la morfología embrionaria, los parámetros morfológicos y los principales estadios de desarrollo.

4.2.1 Morfología embrionaria

Para llevar a cabo la evaluación de los embriones es importante la identificación de las estructuras que lo conforman. Externamente se observa la zona pelúcida (ZP), capa que previene la dispersión de los blastómeros

apoyando la compactación de los mismos (Jun *et al* 1998). Este proceso inicia cuando el embrión presenta 32 células, es decir al quinto día post ovulación (Van Soom *et al* 1997), denominándose a este estado de desarrollo como mórula (figura 1), en el cual internamente se observa el espacio perivitelino y en él una masa compacta de células que más tarde serán diferenciadas de acuerdo a su posición en dos tipos de células: a) del trofoblasto (las cuales darán origen a parte de la placenta) y b) masa celular interna (que conformaran al embrión y sus membranas).

Morfológicamente estos dos tipos de células son diferentes, las del trofoblasto son alargadas y se encuentran a la periferia de las células de la masa celular interna, las cuales son de forma poliédrica irregular (Figura 2) (Massip *et al* 1981).

El estado de desarrollo que continúa de la mórula es el blastocisto, donde los dos tipos de células y la presencia de una cavidad llena de líquido, denominada blastocelo, ocupan la mayor parte del espacio perivitelino (80%) característico del blastocisto.

Por otra parte el diámetro de los embriones bovinos (150 a 190 μ m), el grosor de la zona pelúcida (12 a 15 μ m) y el diámetro de la masa celular interna (108 a 109 μ m) (figura 3), en general son los mismos desde cigotos hasta blastocistos sin importar la raza del animal, sin embargo en blastocistos expandidos el diámetro de la masa celular interna es significativamente mayor (142 μ m) y la zona pelúcida mas delgada (9 μ m) que los embriones en estados tempranos de desarrollo sugiriendo que el adelgazamiento de la zona pelúcida es causa de la eclosión (Nakagawa *et al* 1991).

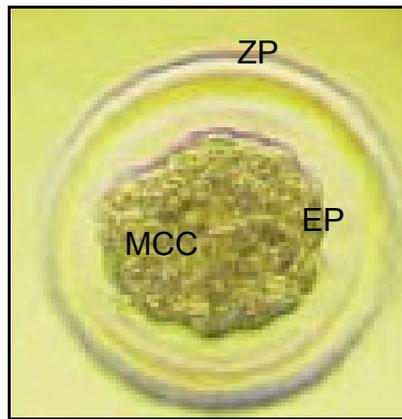


Figura 1. Microfotografía de una mórula en el cual se aprecia su zona pelúcida (ZP), espacio perivitelino (EP) y masa compacta de células (MCC). Tomada de Leroy *et al* (2005b).

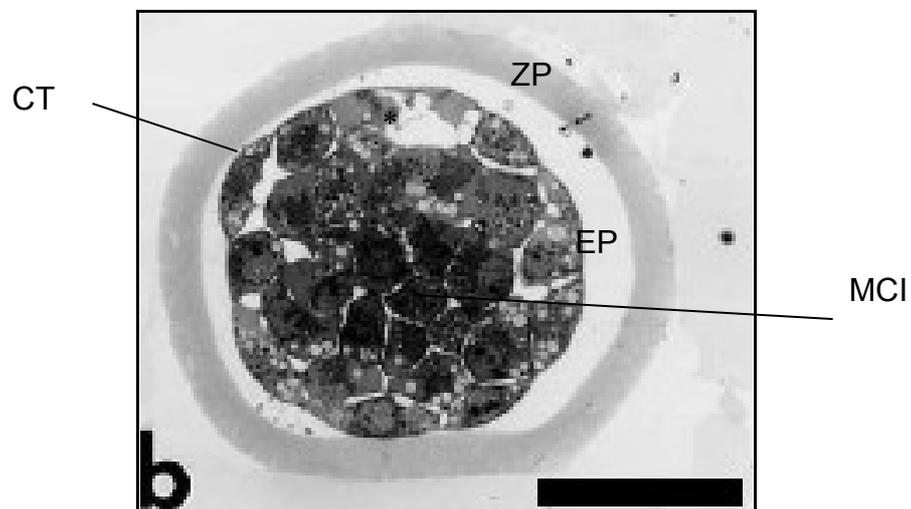


Figura 2. Microfotografía al microscopio de luz del corte semifino de una mórula *Bos taurus*. Externamente se observa la zona pelúcida (ZP), por debajo el espacio perivitelino (EP) y en el interior el embrión representado por un cúmulo de células, las cuales se diferencian en dos tipos: i) las de la periferia corresponden a las células del trofoblasto (CT) las cuales son de forma ovoide ligeramente aplanadas de los polos y ii) las células de la masa celular interna (MCI), las cuales son de forma poliédrica irregular. Entre las células se observan espacios intercelulares (*) que corresponden a la formación temprana del blastocele. Tinción azul de toluidina, Barra 50 μ . Tomado de Abe *et al* 2002.

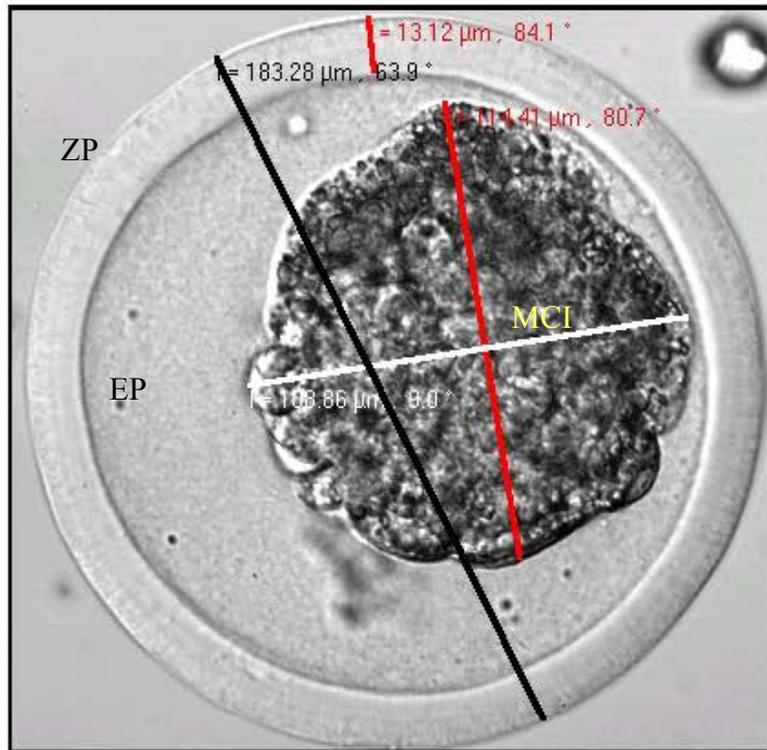


Figura 3. Microfotografía al microscopio de luz de un embrión *Bos taurus* recolectado al día 7 mostrando la morfometría del embrión. Diámetro total del embrión $\Theta E=183.28\mu m$, barra negra; diámetro de la zona pelúcida $\Theta ZP= 13.12\mu m$, barra roja corta y diámetro de la masa celular interna $\Theta MCI= 108.86\mu m- 114.41\mu m$, barra roja larga y blanca. Zona pelúcida (ZP), espacio perivitelino (EP) y masa celular interna (MCI). Aumento 400x

4.2.2 Parámetros morfológicos

Los parámetros morfológicos son las pautas que guían la calidad embrionaria y son los siguientes:

A) Forma, la cual debe ser esférica.

B) Color, debe ser ámbar con una tonalidad uniforme; esta característica esta relacionada con la presencia de vesículas, intracitoplasmáticas. Los embriones muy claros o muy oscuros poseen vesículas, lo que indica problemas metabólicos ya que contienen lípidos que varían en tamaño y número, asociándose con embriones de mala calidad, problemas a la congelación y bajos niveles de sobrevivencia después de ser transferidos (Dorland *et al* 1990, Noriega *et al* 1995, Hill y Kuehner 1998, Leroy *et al* 2005, Van Soom *et al* 2003).

C) El número de blastómeros, está correlacionado con el estado de desarrollo, esperando que contengan más de 30 células, lo que indicaría que es una mórula (estado transferible) (Kuzan 1988). En este estado de desarrollo los blastómeros se encuentran compactados, propiedad que permite una buena nutrición, contribuyendo a la formación del blastocele y adquiriendo a la vista una forma poligonal así como un tamaño uniforme y simétrico.

D) Blastómeros extruídos, este parámetro no es benéfico para el embrión ya que son células que se quedaron en una etapa temprana de desarrollo y se observan como células grandes en el espacio perivitelino, indicando degradación de las células y dependiendo de la cantidad se correlacionará con el grado de degeneración embrionaria disminuyendo por ende su calidad.

E) Zona pelúcida (ZP), debe ser lisa, libre de irregularidades, no delgada, ya que es la capa protectora del embrión que previene la dispersión de los blastómeros, crea un micro ambiente interno y facilita su paso por el oviducto (Keefe *et al* 1997). En el caso de que se encuentre dañada, disminuirá la capacidad de sobrevivencia al congelamiento ocasionando perdida de la

viabilidad embrionaria (Da Silva y Metelo 2005, Noriega *et al* 1995) así como adherencia al plato de petri o a la pajilla (Robertson y Nelson 1998).

4.2.3 Criterios de clasificación

Linares y King (1980) fueron los primeros en citar criterios de clasificación agrupando a los embriones en 3 categorías:

a) Normal, incluye a los blastocistos, los cuales muestran clara diferenciación entre las células de la masa celular interna y trofoblasto, siendo distinguible el blastocele así mismo presentan en el espacio perivitelino, uno o dos cuerpos polares pero no otras células o detritus celulares.

b) En proceso de degeneración, esta categoría contiene a los embriones que no muestran clara diferenciación entre las células del trofoblasto, masa celular interna o blastocele; la ZP del blastocisto presenta algunas irregularidades sin mostrar una buena relación morfológica, encontrando células o detritus celulares en el espacio perivitelino.

c) Degenerados, representa a los embriones con la zona pelúcida rota o con claros signos de degeneración, con desprendimiento de blastómeros, estos últimos de diferentes tamaños o en bajo número.

Más adelante **Lindner y Wright** (1983) redefinieron los criterios con la finalidad de un mejor entendimiento a la evaluación y morfología embrionaria citando 4 categorías. La primera categoría (excelente) agrupa a los embriones que son ideales; es decir de forma esférica, con células simétricas y uniformes en tamaño, color y textura. La segunda categoría (buenos) corresponde a los embriones en los que se observan imperfecciones, como algunos blastómeros extruídos, forma irregular y pocas vesículas. La tercera categoría (regulares) corresponde a embriones clasificados con problemas severos, es decir, blastómeros extruídos con presencia de vesículas e incluso algunas células degeneradas. La cuarta categoría (malos) son los que muestran mayores

irregularidades morfológicas, dentro de las cuales están un gran número de blastómeros extruídos, células degeneradas, células que varían en tamaño, numerosas vesículas, sin embargo la masa celular interna aún parece viable.

Otro tipo de clasificación fue propuesto por **Kuzan** (1988) quien le dio especial importancia al comercio internacional por lo que hizo un listado de las características morfológicas para su descripción las cuales requerían de la aceptación en general de todos los profesionales involucrados en el área, así agrupó a los embriones en 6 categorías:

- 1) Excelente; embrión esférico, zona pelúcida intacta, cúmulo celular perfectamente estructurado con células del mismo tamaño, color y textura.
- 2) Bueno; embrión esférico o ligeramente elipsoidal, zona pelúcida intacta, al centro una masa compacta de células aunque podría apreciarse algún blastómero suelto en el espacio perivitelino.
- 3) Regular; zona pelúcida intacta o dañada, blastómeros de diferentes tamaños, cúmulo celular con un 30 hasta un 60% de blastómeros intactos y un ligero retraso de desarrollo (estadío de 32 células).
- 4) Malo; zona pelúcida intacta o dañada, blastómeros degenerados y sueltos con menos del 30% de blastómeros intactos y tempranos estados de desarrollo (32, 16 células).
- 5) Embriones degenerados; zona pelúcida normalmente intacta, cúmulo celular con aspecto desorganizado y suelto, blastómeros de diferentes tamaños y pignóticos en muchos casos, estados de desarrollo de 2, 4, 8 hasta 16 células.
- 6) Ovocito sin fertilizar, rodeado de una zona pelúcida intacta perfectamente esférica.

Esta última propuesta de clasificación no presenta ninguna ventaja sobre las anteriores, por lo que su uso no ha sido tan propagado como la de Lindner y Wright (1983), clasificación que aún en la actualidad es usada por diferentes investigadores. Sin embargo, al existir diferentes tipos de propuestas, **Robertson y Nelson** (1998) con la finalidad de estandarizar criterios,

publicaron en el Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones las características de cada calidad, solo que en forma numérica, es decir 1,2,3 y 4, también basados en la integridad morfológica:

La calidad 1 o buenos, corresponden aquellos embriones con una masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros uniformes en talla, color y densidad; esto acorde al estado de desarrollo esperado. Las irregularidades deben ser relativamente menores, con el 85% del material celular intacto y la masa embrionaria viable.

La calidad 2 o embriones regulares, cuentan con moderadas irregularidades en la forma de la masa embrionaria, talla, color y densidad de las células individuales; al menos el 50% del material celular debe estar intacto y la masa embrionaria viable.

Los embriones de calidad 3 corresponde a los malos los cuales presentan mayores irregularidades en la forma de la masa embrionaria, talla, color y densidad de las células individuales, por lo que al menos el 25% del material celular debe estar intacto y su masa embrionaria viable.

El grado 4 pertenece a los embriones muertos o degenerados, los cuales no son transferibles.

4.2.4 Estados de desarrollo

Los estados de desarrollo utilizados en la transferencia embrionaria son los mórulas y blastocistos, los cuales tienen la capacidad de sobrevivir a la congelación, método que facilita su comercialización (Mohr y Trounson 1981). Sin embargo, el éxito de estos estados de desarrollo depende del tiempo en que ocurre la primera división, Lonergan *et al* (1999) informan que cuando la primera división ocurre a las 30, 36, 42 y 48 h, la tasa de blastocistos que se obtendrán será de 61, 35, 6 y 0% respectivamente.

Por otra parte, dentro de la clasificación embrionaria la IETS asigna un código de identificación a cada estado de desarrollo, como se muestran en la figura 4.

Así los embriones se clasifican de acuerdo a su grado de desarrollo en: mórulas tempranas, mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados.

Las mórulas (del latín *mora*) normalmente son encontradas entre el día 5 y 6; dentro de los códigos de clasificación propuestos por la IETS, se refiere como estado 3 a la mórula temprana y 4 a la mórula.

La mórula temprana es definida como una agrupación de células que tienden a ser esféricas, observándose los blastómeros individuales, sin embargo son difícil de discernir uno de otro, ocupando la masa celular el 80% del espacio perivitelino. La mórula es denominada mórula compacta, cuando los blastómeros están unidos fuertemente entre ellos formando una masa compacta de células las cuales ocupan del 60 a 70% del espacio perivitelino.

Los blastocistos, son clasificados en cuatro etapas de su desarrollo: **a)** blastocisto temprano, **b)** blastocisto, **c)** blastocisto expandido y **d)** blastocisto eclosionado; siendo codificados numéricamente por la IETS como 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

a) Blastocisto temprano, este es un embrión en el cual se ha formado una cavidad llena de líquido, llamada blastocele, dando generalmente una apariencia de anillo, donde el embrión ocupa del 70 a 80% del espacio perivitelino. En este estado de desarrollo es posible diferenciar entre la masa celular interna y las células del trofoblasto.

b) Blastocisto, se caracteriza por presentar una mayor diferenciación entre las células del trofoblasto, que se observan más oscuras y las células de la masa

celular interna, que son más evidentes. El blastocele ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

c) Blastocisto expandido, el diámetro del embrión incrementa dramáticamente, junto con un adelgazamiento de la zona pelúcida, en aproximadamente 1/3 del grosor original. Los embriones recolectados en esta etapa frecuentemente están colapsados, esto es caracterizado por una pérdida completa o parcial del blastocele.

d) Blastocisto eclosionado, son embriones que se encuentran en proceso de eclosión o definitivamente fuera de la zona pelúcida. Estos embriones pueden ser esféricos, con un muy buen definido blastocele (no si están colapsados). La identificación de este estado suele ser difícil para un evaluador sin experiencia (Lindner y Wright 1983).

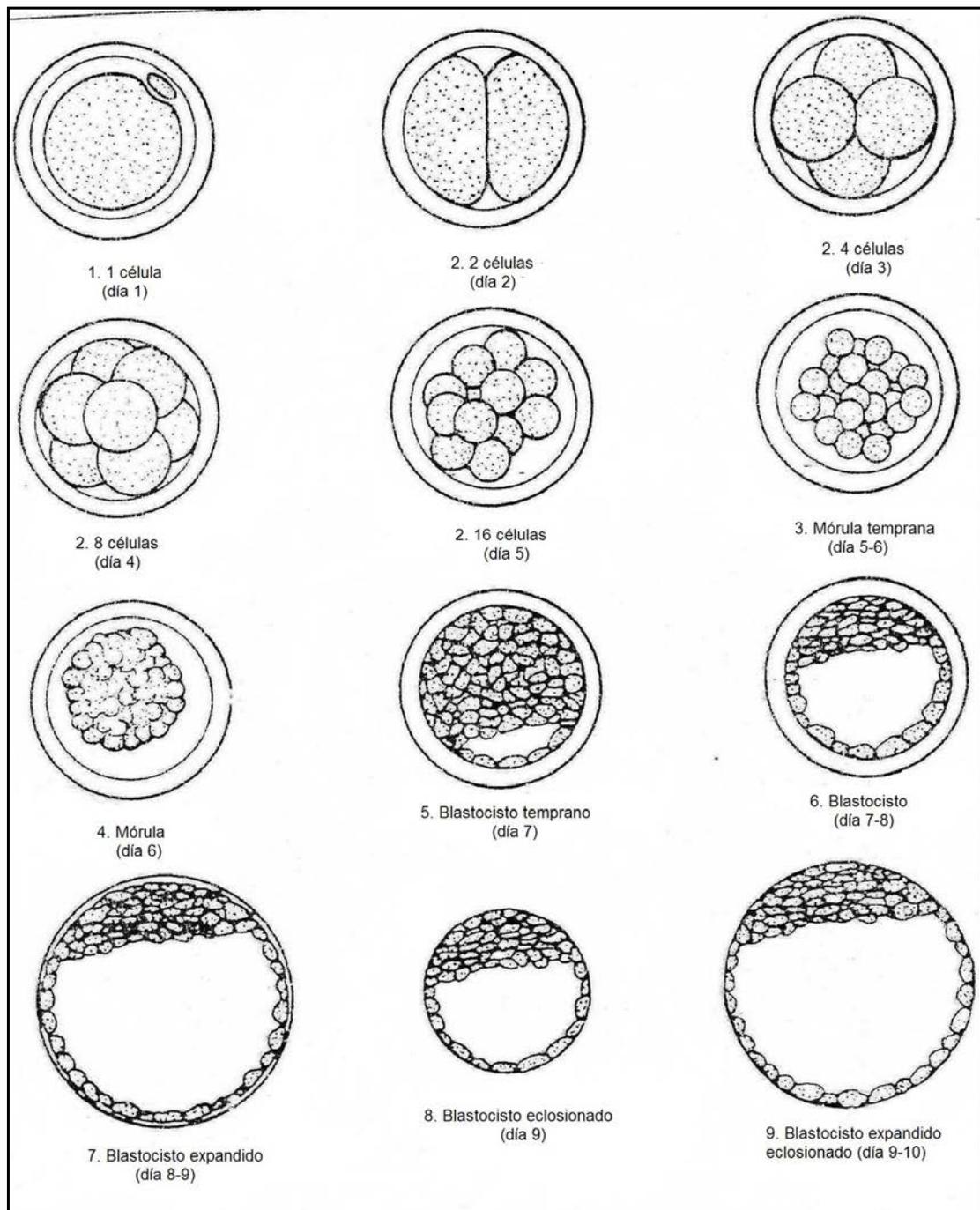


Figura 4. Código numérico de los estados de desarrollo embrionario asignados por la IETS. El número 1 identifica a un embrión de una célula. El número 2 clasifica a los embriones entre 2 y 16 células (aproximadamente del día 2 al 5). El número 3 agrupa a mórulas tempranas, y del 4 al 9 comprenden embriones en estado de post-compactación como son ilustrados en la imagen. (Tomado del Manual de la IETS)

4.3 EVALUACIÓN DE CALIDAD POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Antes de llevar a cabo la evaluación de calidad a nivel ultraestructural de los embriones es necesario conocer las diferencias a nivel celular entre los dos estados de desarrollo embrionario, para lo cual se presentan las características ultraestructurales de mórulas y blastocistos.

4.3.1 Características ultraestructurales de mórulas

Los embriones a través de su desarrollo no presentan ninguna diferenciación hasta llegar al estado de desarrollo denominado mórula en el cual las actividades fisiológicas de los embriones incrementan observándose cambios ultraestructurales relacionados con el desarrollo y sobrevivencia después de la transferencia (Abe *et al* 2002).

Uno de los primeros procesos que se observan en el desarrollo embrionario es la compactación, ya que inicia al quinto día cuando el embrión presenta 32 células (Van Soom *et al* 1997, Koyama *et al* 1994) dando lugar a la formación de una mórula.

Ultraestructuralmente las mórulas, presentan dos tipos de células, las del trofoblasto y masa celular interna. Las células del trofoblasto se localizan en la periferia de la masa compacta y se caracterizan por presentar una baja electrodensidad en su citoplasma, así como proyecciones cortas y abundantes que se despliegan de la membrana hacia el espacio perivitelino correspondiendo a microvellosidades. En relación a organelos se observan numerosas mitocondrias, aparato de Golgi, el cual ocupa la mayor parte del citoplasma, abundantes vesículas, gotas lipídicas y escaso retículo endoplásmico. Las células de la masa celular interna se encuentran localizadas por debajo de las células del trofoblasto y son distinguidas por la moderada

electrodensidad del citoplasma. En relación a organelos presentan numerosas mitocondrias, vesículas, lisosomas y en menor cantidad gotas lipídicas, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso. El núcleo en ambos tipos de células, morfológicamente cuenta en su interior con material electrodenso granular que corresponde a cúmulos de cromatina. Los tipos de unión que se presentan entre las células del trofoblasto son estrechas y desmosomas. Además, entre las células del trofoblasto y masa celular interna, así como entre las mismas células de la masa celular interna, existen uniones comunicantes (Abe *et al* 2002, Kaňka *et al* 1999, Plante y King 1994).

Finalmente las mórulas, como todos los demás estados de desarrollo (excepto el blastocistos eclosionado), están rodeadas por una cubierta glicoproteica la cual corresponde a la zona pelúcida, esta debe observarse íntegra y con una apariencia porosa, así como con proyecciones citoplasmáticas de la corona radiada que anteriormente hacían contacto con el ovocito (Fléchon y Gwatjin 1980, Linares y Plöen 1980, Visintin *et al* 2002).

4.3.2 Características ultraestructurales de los blastocistos

Las células del trofoblasto son de forma alargada y se encuentran localizadas en la periferia y al igual que en las mórulas son fáciles de diferenciar por la ligera electrodensidad de su citoplasma. La membrana plasmática en la parte apical de las células proyectan numerosas y largas microvellosidades hacia el espacio perivitelino y también es posible observar procesos de endocitosis. Los núcleos de las células morfológicamente presentan en su interior material electrodenso granular que corresponde a cúmulos de cromatina y presentan la misma forma de las células (alargado). En relación a los organelos se encuentran abundantes mitocondrias de forma redonda y /o alargada, estas últimas en mayor proporción, también se observan gotas lipídicas y vesículas pero no tan abundantes como en la mórula. Por otra parte, las células de la

masa celular interna son de forma poliédrica irregular y se encuentran situadas en uno de los polos del embrión, ya que el otro contiene el blastocele. Estas células son de moderada electrodensidad comparadas con las del trofoblasto y no están polarizadas (no presentan microvellosidades). El núcleo es esférico y contiene dos nucleolos. El citoplasma presenta pocas mitocondrias y lisosomas; el aparato de Golgi aunque escaso es posible apreciarlo ocupando una pequeña proporción cerca del núcleo, también se logra observar el retículo endoplásmico rugoso y en comparación con las células del trofoblasto existe una mayor proporción de gotas lipídicas. Los complejos de unión que existen son los mismos que en las mórulas y además es factible apreciar células muertas fagocitadas (Abe *et al* 1999, Linares y Plöen 1981, Massip *et al* 1981, Plante y King 1994, Fair *et al* 2001).

4.3.3 Muerte celular

En el desarrollo embrionario se ha observado que existe muerte celular por lo que con la finalidad de determinar la calidad del embrión es importante reconocer el grado de muerte celular existente en mórulas y blastocistos, así como diferenciar ultraestructuralmente entre necrosis y apoptosis.

La muerte celular juega un papel importante en el desarrollo embrionario. Existen dos formas de muerte celular, necrosis y apoptosis, las cuales se diferencian con base en su morfología. La necrosis, es caracterizada por la desintegración nuclear, hinchamiento celular, ruptura de membranas tanto internas como externas, con la consiguiente liberación de enzima al exterior y daño en las células vecinas; este tipo de muerte es considerada como accidental. La necrosis es iniciada por algún daño a la célula como hipoxia, estrés calórico o exposición a toxinas (Wyllie *et al* 1980). En contraste, la apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, condensación citoplasmática, fragmentación nuclear y ausencia de células vecinas afectadas;

indicativos todos estos cambios de que la muerte celular programada solo afecta a una célula, la cual mas tarde será fagocitada (Matwee *et al* 2000, Yang y Rajarnabendran 1999).

El papel de la apoptosis o muerte celular programada durante los primeros estados de desarrollo embrionario es desconocido pero podría ser la eliminación de células anormales o con un inapropiado potencial de desarrollo (Hardy 1997). Se ha reportado que el porcentaje de blastocistos bovinos que presentan anomalías cromosómicas son el 72% *in vitro* y el 28% *in vivo* (Viuff *et al* 1999) indicando que los embriones desarrollados de manera no natural presentan un mayor número de anomalías o irregularidades que son eliminadas mediante apoptosis.

Por otra parte, el grado de muerte celular varía con la edad del embrión, Hardy (1997) en una extensa revisión informa que la muerte celular está relacionada con el número de células, observándose un mayor porcentaje en los blastocistos. De igual manera Matwee *et al* (2000) al evaluar el porcentaje de apoptosis en ovocitos inmaduros, ovocitos maduros, embriones de 8 - 16 células, mórulas y blastocistos encontraron el mayor grado de muerte para este último estado de desarrollo. Estos hallazgos concuerdan con Gjørret *et al* (2003) quienes concluyen que el blastocisto es el estado de desarrollo con el más alto índice de apoptosis, así como también un mayor porcentaje en las células de la masa celular interna.

Hardy (1997) indica que el número de células muertas en blastocistos de ratón raramente exceden de 2 células apoptóticas en el trofoblasto ó 4 en la masa celular interna, concordando esto con los resultados obtenidos por Márquez *et al* (2004) quienes encontraron no más de 7 células apoptóticas en embriones bovinos. Sin embargo, Hardy (1997) también encontró que en conejos escasamente se presenta la muerte celular; por lo que el porcentaje de

apoptosis que se encuentre no sólo se debe al estado de desarrollo si no también a la especie.

Por lo tanto, la apoptosis puede ser utilizada como un criterio adicional en la evaluación morfológica de la calidad y viabilidad embrionaria. Así, en diferentes estudios, al correlacionar la muerte celular con la calidad embrionaria han encontrado una diferencia (10 vs 27% de células apoptóticas) en embriones de buena y mala calidad, respectivamente (Hardy *et al* 1989, Contreras *et al* 2007, Pomar *et al* 2005); sugiriendo un menor número de células apoptóticas para embriones de buena calidad que para los de regular y mala.

4.3.4 Importancia de algunas características ultraestructurales referentes a la calidad celular

La zona pelúcida (ZP), es una capa glicoproteica que rodea al ovocito y al embrión en los estados tempranos de desarrollo, presentando importantes funciones tanto en la fertilización como en el desarrollo embrionario. En la mayoría de los mamíferos la ZP esta compuesta por 3 glucoproteínas, aunque en algunas especies por 4. Una de estas glucoproteínas actúa como receptor para el espermatozoide, permitiendo así que se lleve a cabo la fertilización (Wassarman 1999, Keefe *et al* 1997, Sinowatz *et al* 2001). Una vez que el óvulo fue fertilizado, este comienza a sufrir segmentaciones dentro del oviducto (Eysteone y First 1990), el cual secreta proteínas que se adhieren a la ZP confiriéndole resistencia para su posterior manipulación (Duby *et al* 1997, Itoi *et al* 2007). Tres días después del proceso de blastulación, se observa la degradación de la ZP, denominándose a este proceso eclosión (Rutledge *et al* 1999a). Otra de las funciones que presenta la ZP es el crear un micro ambiente que permita mantener unidos a los blastómeros para que se lleve a cabo el proceso de compactación, el cual, no se realizaría si la ZP presentara algún daño (Jun *et al* 1998, Betteridge y Féchon 1988).

Por otra parte, existen informes donde la viabilidad del embrión se ha visto comprometida por daños que presentó la ZP por el proceso de congelación (Da Silva y Metelo 2005). Baguisi *et al* (1998) mencionan que el 50% de los embriones de buena y regular calidad sometidos a la criopreservación fallan al momento de la eclosión, esto se explica por los daños presentados en la ZP que dan como resultado la pérdida de la capacidad de desarrollo embrionario. Con base en esto, Wilson *et al* (1987) mencionan que en los equinos los estados de desarrollo que sobreviven a la congelación son los que se encuentran antes del día 6 ya que aun poseen su ZP. Estos hallazgos demuestran la importancia de la presencia de la ZP en donde sin ella la congelación embrionaria no tiene éxito.

A nivel ultraestructural, por medio del microscopio electrónico de barrido, se han detectado sobre la superficie de la ZP un promedio de 46 poros con un diámetro de 0.49 μ m, sugiriéndose que la función de estos es transportar y difundir nutrientes así como prevenir la entrada de virus o bacterias (Da Silva y Metelo 2005). Además, Vanronse *et al* (1999) informaron que el diámetro de los poros y el número de ellos se reduce después de la fertilización bloqueando la entrada de virus como el de la diarrea viral bovina y herpes virus, los cuales presentan un diámetro menor al de los poros.

Las microvellosidades son otras estructuras que juegan un papel esencial dentro de la calidad celular, Koyama *et al* (1994) informaron que estas aparecen a partir del estado de desarrollo de 8 células. Estas son delgadas y en forma de hebra y su función, se ha relacionado con la formación del blastocelo, ya que mediante la bomba de Na⁺/K ubicada en la membrana plasmática de las células del trofoblasto, regula el volumen celular y la concentración de iones (Watson *et al* 1999, Linares y Plöen 1981). Es decir, la ausencia de microvellosidades en el estado de mórulas o blastocistos produce la incapacidad de las células para continuar con el desarrollo. Sin embargo,

después de la eclosión, ya no son tan necesarias ya que al día 18 comienzan a desaparecer encontrándose ausentes al día 20; esto justo cuando se lleva a cabo el primer contacto firme entre las células trofoblásticas y el epitelio uterino (Guillomot y Guay 1982). De aquí, que la presencia y abundancia de las microvellosidades en los estados de mórulas y blastocistos son tomados en consideración para la evaluación de calidad a nivel celular.

Por otro lado, la formación del blastocele depende de la retención del líquido, permeabilidad de las células del trofoblasto y por la naturaleza de sus uniones (Massip *et al* 1981, Hay-Schmidt *et al* 1998). Desde el estado de desarrollo de 2 células hasta la formación de la mórula, los blastómeros han estado acoplados eléctricamente (Boni *et al* 1999) y no es sino hasta la compactación cuando se comienzan a desarrollar los complejos de unión entre los blastómeros, estableciéndose primeramente las uniones estrechas entre las células del trofoblasto y más tarde los desmosomas. La unión estrecha, tiene la característica de ser impermeable al paso de macromoléculas regulando así el transporte de agua y solutos entre las células, así como también mantener la arquitectura del blastocele (Mohr y Trounson 1981). Los desmosomas, son caracterizados como uniones fuertes siendo estos capaces de resistir la presión que ejerce el blastocele durante la expansión del blastocisto (Massip *et al* 1981, Watson *et al* 1999). Cabe mencionar que los complejos de unión no sólo son importantes para el subsiguiente desarrollo embrionario si no que también son esenciales para la sobrevivencia de los embriones antes y después del proceso de criopreservación (Mohr y Trounson 1981). Por lo que la evaluación de la presencia de complejos de unión, es también de suma importancia para el desarrollo.

4.3.5 Diferencias ultraestructurales entre especies

En un estudio comparativo a nivel ultraestructural entre blastocistos de diferentes especies como el humano, ratón y el bovino encontraron que existen características ultraestructurales en común como son los complejos de unión entre células del trofoblasto, las microvellosidades, las mitocondrias bien desarrolladas y numerosos ribosomas. Sin embargo, también encontraron diferencias como por ejemplo la ausencia del endodermo primitivo en el blastocisto bovino pero no en el humano (Mohr y Trounson 1982). Estos hallazgos son apoyados por Maddox-Hyttel *et al* (2003) quienes encontraron que el endodermo primitivo no se observa en el embrión bovino si no hasta el día 9 cuando el blastocisto es liberado de la zona pelúcida.

Otra diferencia observada entre especies es la formación de una cápsula embrionaria al día 6 en el embrión equino la cual aparece sobre la superficie de la zona pelúcida, observándose al día 8 con un grosor de $1\mu\text{m}$ y sin zona pelúcida y para el día 11 el diámetro de la capsula es de $3\mu\text{m}$, lo que infiere que la cápsula se forma al día 6 aumentando su grosor regularmente y eclosionando de ella el embrión al día 21 (Flood *et al* 1982).

Respecto a las microvellosidades Koyama *et al* (1994) al comparar los embriones bovinos con el de los conejos mediante el microscopio electrónico de barrido observaron que las microvellosidades del conejo son cilíndricas y más delgadas mientras que las del bovino son en forma de hebra. Por otra parte, también encontraron que en los embriones bovinos en estado de 2-8 células, los blastómeros poseen microvellosidades que poco a poco van aumentando hasta hacerse predominantes en el estado de 16 células, por lo que este tipo de embriones exhiben una fase transicional de polaridad característica que no ha sido reportada en otra especie.

Por otra parte, en relación a los rumiantes, Rizos *et al* (2002) compararon ultraestructuralmente a blastocistos ovinos y bovinos *in vitro* encontrando diferencias a nivel celular como: **a)** un esparcido agrupamiento de las microvellosidades en los bovinos e implicadas posiblemente con la baja capacidad de absorción y transporte activo de la célula; **b)** mitocondrias con escasas crestas lo cual puede afectar la respiración celular y; **c)** una mayor cantidad de detritus celular en el bovino que en el ovino.

Adicionalmente en los embriones vitrificados encontraron mejores grados de sobrevivencia para los ovinos que bovinos, sugiriendo estos hallazgos que las características ultraestructurales de los blastocistos ovinos confieren una mayor resistencia a la vitrificación que a los bovinos.

4.3.6 Criterios ultraestructurales de clasificación

Los criterios de evaluación citados a continuación son dirigidos a embriones *in vivo*, ya que en los obtenidos de forma *in vitro* la morfología difiere (Crosier *et al* 2000,2001), sugestivo de que el sistema de cultivo altera varias de las características morfológicas.

De las alteraciones morfológicas *in vitro* encontradas en los embriones Shamsuddin y Martínez (1994) observaron vacuolización citoplasmática, complejos de unión cortos y poco abundantes, menor cantidad de microvellosidades, numerosos fagosomas (indicativo de apoptosis), vesículas citoplasmáticas, gotas lipídicas, mitocondrias con escasez de crestas (inmaduras) todo esto en ambos tipos de células. Por otra parte Mertens *et al* (2007) señalan otras diferencias entre embriones *in vivo* e *in vitro*, las cuales involucran un adelgazamiento tanto de la zona pelúcida (12µm) comparado con el tamaño original (30µm) como en el tamaño de los poros, los cuales son más pequeños que los encontrados *in vivo*. Estos hallazgos reflejan la influencia

negativa sobre la viabilidad de los embriones obtenidos *in vitro*, además, de coincidir en las características observadas en los embriones de mala calidad.

De las características que mayormente sobresalen en los embriones obtenidos *in vitro* es la cantidad de gotas lipídicas (Abe *et al* 1999a, 2002a), la cual aumenta conforme la calidad del embrión disminuye, lo que además ocasiona que la congelación sea poco exitosa como fue demostrado por Ushijima *et al* (1999) quienes al centrifugar a los embriones para retirar las gotas lipídicas demostraron que el retiro de los lípidos aumenta el éxito en la criopreservación de estos.

Por otra parte, el establecimiento de los criterios de clasificación utilizados para la evaluación microscópica de los embriones *in vivo* fueron descritos por Abe *et al* (1999, 2002) quienes evaluaron mórulas y blastocistos mediante el microscopio de contraste de fases invertido (método por el cual se tiene una mayor apreciación del embrión) para posteriormente describir las características ultraestructurales de cada estado de desarrollo en la calidad asignada (buenos, regulares y malos), concordando sus resultados con las características citadas por Chartrain y Picard (1988) quedando los criterios de clasificación citados de la siguiente manera.

Calidad 1 ó buenos: Este grupo de embriones presenta la zona pelúcida intacta. El espacio perivitelino se encuentra libre de detritus celulares y/o blastómeros extruídos.

Las células del trofoblasto presentan abundantes proyecciones citoplasmáticas dirigidas hacia el espacio perivitelino y que corresponden a microvellosidades; que dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentre el embrión serán cortas (mórula) o largas (blastocisto). A nivel del citoplasma las células del trofoblasto se caracterizan por presentar una ligera electrodensidad en comparación de las células de la masa celular interna. En relación a los

organelos se observan abundantes mitocondrias de forma redonda y/o alargada con las crestas muy abundantes, tanto el aparato de Golgi como el retículo endoplásmico se encuentran bien definidos, los ribosomas se presentaron como gránulos oscuros, los lisosomas secundarios son poco abundantes, existen escasos fagosomas (relacionado con la apoptosis) y también pocas gotas lipídicas. Entre las células del trofoblasto se observan largos y numerosos complejos de unión como desmosomas y uniones ocluyentes.

Las células de la masa celular interna presentan los mismos organelos pero en menor cantidad, no están polarizadas (sin microvellosidades) y el tipo de unión que mas se observa es la comunicantes.

Calidad 2 o regulares: la zona pelúcida se observa intacta, en el espacio perivitelino pueden presentarse en algunas ocasiones detritus celulares y/o blastómeros extruídos. Estos últimos son esféricos, sin microvellosidades y en su citoplasma contienen numerosas vesículas y gotas lipídicas. A nivel celular es difícil distinguir entre los dos tipos de células por su densidad citoplasmática. Las células del trofoblasto presentan menos microvellosidades que las vistas en los embriones de buena calidad. Internamente se aprecia el núcleo de forma redonda con su envoltura nuclear bien definida así como cúmulos de cromatina densa y en algunas ocasiones es posible observar vacuolas intracitoplasmáticas. También se observan diversos organelos como mitocondrias redondas y/o alargadas cuyas crestas son escasas e inclusive algunas mitocondrias pueden estar vacuoladas, el aparato de Golgi es escaso, el retículo endoplásmico en su mayoría es liso y poco abundante, existe la presencia de ribosomas libres, los lisosomas secundarios son abundantes, existe moderada proporción de fagosomas y una cantidad mayor de vesículas y gotas lipídicas todo ello en comparación con los de buena calidad. Las uniones presentes en este tipo de células son las uniones de tipo ocluyente y

desmosomas, sin embargo se observan en menor cantidad y no tan largos como los de buena calidad.

Las células de la masa celular interna presentan los mismos organelos que las células anteriores pero en menor proporción, el tipo de unión entre ellas es comunicante y están desprovistas de microvellosidades.

Calidad 3 o malos: la zona pelúcida se observa intacta, en el espacio perivitelino se encuentra abundante presencia de detritus celulares así como blastómeros extruídos. A nivel celular, no se logran distinguir diferencias en la densidad citoplasmática entre los dos tipos de células. Las células del trofoblasto presentan muy pocas microvellosidades o inclusive pueden estar ausentes. Internamente se aprecia el núcleo con la envoltura nuclear en algunos casos poco perceptible y el nucleolo vacuolado. Las células del trofoblasto presentan diversos organelos como mitocondrias de forma redonda y/o alargada con crestas escasas y vacuoladas, el aparato de Golgi es difícil de identificar, el retículo endoplásmico también es escaso, los lisosomas secundarios son abundantes así como también los fagosomas, vesículas y gotas lipídicas. Los complejos de unión no se encuentran definidos.

Las células de la masa celular interna presentan los mismos organelos que las células del trofoblasto pero en menor proporción, el tipo de unión entre ellas es comunicante y están desprovistas de microvellosidades.

De acuerdo a los criterios de clasificación, se prefiere utilizar los embriones de calidad 1 para ser congelados ya que presentan mayores posibilidades de sobrevivir que los de mala calidad, ya que la criopreservación ocasiona cambios ultraestructurales. Mohr y Trounson (1981) encontraron que después de la congelación se presenta la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, de la membrana nuclear e inclusive el colapso del blastocele. Por su parte, Fair *et al* (2001) señalan el encogimiento del embrión, daño a las microvellosidades y acumulación de detritus celulares en el espacio perivitelino.

Además, Bagusí *et al* (1998) señalan que la congelación daña la ZP, lo que trae como consecuencia bajos porcentajes de preñez por el simple hecho de que hay embriones que no eclosionan, observando que del 70% de los embriones de calidad 1 y 2 el 50% de ellos fallan en la eclosión.

Por otra parte los complejos de unión resultan ser fuertes a la congelación así como el retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias (Mohr y Trounson 1981), de ahí la importancia de su evaluación en los embriones a nivel ultraestructural.

4.4 OTRAS FORMAS DE EVALUAR LA CALIDAD EMBRIONARIA

En la actualidad con el advenimiento de nuevas tecnologías, como la manipulación de embriones *in vitro*, los investigadores se han dado a la tarea de identificar otras técnicas con las cuales se pueda medir la viabilidad embrionaria, ya que con la evaluación morfológica los resultados obtenidos son imprecisos principalmente cuando se emplea para ello la microscopía estereoscópica, sin embargo, diversos autores han sugerido que el uso del microscopio de contraste de fases podría mejora la apreciación del embrión y por lo tanto la clasificación (Linares y Plöen 1981, Dorland 1990, Linares y King 1980).

De las técnicas descritas para una evaluación objetiva y no invasiva del embrión se tienen el cultivo embrionario, la medición del consumo de oxígeno, la actividad metabólica, el uso de Alamarblue (un indicador de crecimiento) y la producción de interferón por las células del trofoblasto.

4.4.1 Cultivo embrionario

El cultivo embrionario se ha caracterizado por ser un método no invasivo el cual provee información acerca de la calidad embrionaria (Abe *et al* 2002a, Balaban y Urman 2003).

Contreras *et al* (2007) al emplear un sistema de cultivo hasta por 24 horas como método para evaluar la viabilidad en los embriones descongelados producidos *in vivo* encontraron que los embriones clasificados por microscopía estereoscópica como buenos y regulares no presentaron cambios en el desarrollo hasta las 7 horas, mientras que los de mala calidad a las 2 horas ya presentaban cambios. Estos resultados señalan que el cultivo es un método efectivo para evaluar la viabilidad y confirmar la calidad de los embriones recién descongelados para su transferencia.

4.4.2 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno refleja el número de células y la actividad mitocondrial; la cual es valorada mediante el microscopio de escaneo electroquímico (Sakagami *et al* 2007).

Diversos reportes han concluido que un alto consumo de oxígeno es indicativo de que el embrión posee un potencial alto de desarrollo (Moriyasu *et al* 2007, Abe *et al* 2007). Lopes *et al* (2005) encontraron que existe una relación entre la respiración y el estado de desarrollo, donde los embriones al día 3 (embrión de 4 células) presentan un bajo consumo de oxígeno comparado con los del día 7 (blastocisto). De la misma manera Sakagami *et al* (2007) y Moriyasu *et al* (2007) indican que el consumo de oxígeno es mayor para blastocistos que para mórulas (0.96 vs $0.52 \times 10^{-4} \text{ mol s}^{-1}$, respectivamente).

Por otra parte, Sakagami *et al* (2007) en relación a la calidad embrionaria observaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre embriones calidad 1 y 2. Estos hallazgos indican que la medición del consumo de oxígeno puede ser una alternativa para evaluar embriones antes de ser transferidos.

4.4.3 Actividad metabólica

Una vez que se activa el genoma embrionario (4 a 8 células) se modifican los patrones de la actividad metabólica. Los nutrientes más significantes en el desarrollo embrionario son los carbohidratos y los aminoácidos los cuales proveen energía y mantienen la función embrionaria (Gardner 1998).

Pinyopummintr' y Bavister (1996) encontraron que en los estados tempranos de desarrollo (4 a 8 células) el piruvato y el lactato son las fuentes principales de energía, sin embargo al irse diferenciando, la glucosa se vuelve indispensable hasta la eclosión.

Por otra parte, Walker *et al* (1996) mostraron que los aminoácidos son importantes tanto en el desarrollo temprano como en la morfología del embrión. Daniel y Krishnan (1967) encontraron 10 aminoácidos esenciales para el crecimiento y expansión del blastocisto (metionina, serina, treonina, arginina, lisina, histidina, triptofano, fenilalanina, leucina, y valina). Por su parte, Hugentobler *et al* (2006) al analizar el fluido del oviducto y útero, encontraron que la glicina es el aminoácido que se encuentra en mayor proporción, aunque su concentración en el útero varía de acuerdo al día, no así en el oviducto. Estos resultados demuestran que conforme el embrión se va desarrollando la demanda de energía aumenta.

No obstante, la evaluación morfológica se presume que refleja la actividad metabólica del embrión por lo que Rondeau *et al* (1995) y Gardner (1998) sugirieron medir el metabolismo como un método para valorar el desarrollo embrionario y la viabilidad. Rondeau *et al* (1995) incubaron en un medio de cultivo metabólico químicamente definido embriones de buena y regular calidad en un grupo y embriones de mala calidad en otro, y al medir la utilización de glucosa e incorporación de metionina encontraron que los embriones agrupados como malos presentaron un bajo metabolismo mientras que los embriones de buena y regular calidad no necesariamente presentaban una actividad metabólica normal. Estos resultados son indicativos de que los parámetros morfológicos no siempre reflejan una competencia metabólica y que los defectos funcionales no son detectados a la evaluación visual, sugiriéndose la implementación de esta prueba como complementaria.

4.4.4 Indicador de crecimiento (ALAMARBLUE™)

Gracias a la eficacia de las nuevas tecnologías reproductivas relacionadas con la producción de embriones bovinos *in vitro*, se agrega a la lista otra prueba para evaluar la calidad embrionaria basada en el desarrollo del mismo, lo que se correlaciona directamente con el parámetro específico de crecimiento. Carnegie *et al* (1998) proponen la evaluación de la viabilidad embrionaria por medio de Alamarblue™ (AB; AccuMed internacional Inc., Westlake, OH) el cual es un indicador fluoro métrico y colorímetro del crecimiento al reaccionar a las condiciones reductoras del medio de cultivo ocasionado en presencia del crecimiento de las células. Estos autores sugieren que Alamarblue™ no solo cumple como un indicador de la viabilidad embrionaria sino además es una prueba sensible, no invasiva, no tóxica y rápida para determinar la calidad de los embriones bovinos y de ratón.

4.4.5 Producción de interferón

El interferón trofoblasto (IFN- τ) es una proteína producida por las células del trofoblasto con la función de inhibir la producción de los receptores para la oxitocina y de esta manera interrumpir la liberación de prostaglandina, permitiendo que e lleve a cabo el reconocimiento de la gestación.

El IFN- τ es secretado por blastocistos bovinos por lo que es posible detectarlo en un medio de cultivo (Larson *et al* 1999, Kubisch *et al* 1998). Ledezma *et al* (1993) evaluaron la producción de interferón trofoblástico con la finalidad de determinar si la expresión inicial del interferón reflejaba el estado de desarrollo o la calidad embrionaria; para esto agruparon a los blastocistos en tempranos, expandidos y eclosionados en dos calidades buenos y regulares, encontrando que la producción de IFN- τ , en relación al estado de desarrollo, fue mayor para los blastocistos eclosionados que en los tempranos o expandidos; en relación a la calidad se observó una mayor producción del mismo en los embriones buenos que en los regulares. Estos hallazgos sugieren que el medir la producción de IFN- τ puede ser utilizado como un método confiable para la evaluación embrionaria la cual evidentemente esta relacionada con la calidad.

4.5 FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD EMBRIONARIA

La calidad del embrión se ve afectada por diferentes factores como son el evaluador, la raza de la donadora, edad, época del año en que son recolectados los embriones y la calidad del ovocito (Callesen *et al* 1995).

4.5.1 Evaluador

El evaluador es la persona que juzga la viabilidad del embrión por medio de parámetros morfológicos, asignándole para ello a cada uno un grado de calidad (bueno, regular y malo) que representa las posibilidades de éxito de una gestación.

Callesen *et al* (1995) informaron que al considerar el estado de desarrollo y calidad embrionaria por separado, solo el grado de calidad es significativamente influenciado por el evaluador, hallazgo que es apoyado por Farin *et al* (1995) quienes encontraron que existe una mejor concordancia entre evaluadores para asignar el grado de desarrollo a los embriones que para la calidad (89 vs 68 %, respectivamente). De igual manera, Van Soom *et al* (1996) mediante un análisis estadístico de la prueba de kappa determinaron que la concordancia entre evaluadores para asignar la calidad es pobre. Por otra parte De Leeuw (1996) con la participación de 29 evaluadores con experiencia evaluaron, mediante cintas de video, 18 embriones producidos *in vivo* antes y después de congelar, encontrando variaciones en 4 de los evaluadores por lo que concluye que las cintas de video pueden ser usadas para la detección de personas que deberían de volver a ser entrenadas en el clasificado de embriones. Estos hallazgos demuestran como la experiencia del evaluador es fundamental para asignar la calidad correcta.

Con base en lo anterior, la clasificación asignada a los embriones *Bos indicus* es inexacta como lo demuestran Aguilar *et al* (2002) quienes después de asignarle a cada embrión un grado de calidad, por medio de microscopía estereoscópica (MEst), volvieron a clasificar a los embriones pero esta vez a nivel ultraestructural con la ayuda de microscopía electrónica de transmisión (MET). Ellos encontraron que del 51% de los embriones clasificados como buenos por el primer método al ser evaluados por MET solo un 24% pertenecían a esa calidad, así mismo se observó un aumento en los embriones clasificados como regulares y malos los cuales pasaron de 24 a 29% y 24 a 46%. Estos resultados demuestran que los embriones no fueron clasificados en la correcta calidad y que el principal problema de la clasificación se encuentra en los embriones de regular calidad los cuales son confundidos con buenos y malos.

En relación al método de clasificación, es decir al microscopio estereoscópico, diversos autores han propuesto el uso del microscopio de contraste de fases invertido para la evaluación embrionaria ya que mejora la apreciación de los embriones y también así se mejora la asignación de la calidad y por lo tanto los porcentajes de preñez en la transferencia embrionaria (Linares y Plöen 1981, Dorland 1990, Linares y King 1980).

4.5.2 Razas

La raza de la donadora es una fuente significativa de variación en la transferencia embrionaria, afectando tanto el desarrollo embrionario como el número de embriones viables (Asada *et al* 2004, Krininger *et al* 2003, Callesen *et al* 1995). Donaldson (1984) evaluó 13 razas diferentes en relación a producción y número de embriones viables, de las cuales las mejores para la producción de embriones fueron Brangus (16), Simbrah (16) y Beefmaster (13) y para el número de embriones transferibles las mejores fueron Simmental (7),

Brangus (7), Chianina (6), Beefmaster (6), Simbrah (6) y Saler (6). Estos resultados muestran que de las 13 razas sólo 6 fueron las que sobresalieron como óptimas donadoras de embriones, sugiriendo diferencias entre ellas para responder a un trabajo de transferencia embrionaria.

Otros estudios realizados en ganado Holstein encontraron que el número de embriones transferibles fue de 6 (Hasler *et al* 1983, 1992; Barrios *et al* 1982, Neto *et al* 2004) mientras que para el cebú de 3 (Donaldson 1984, Aguilar *et al* 2002, Márquez *et al* 2005, Neto *et al* 2004), indicando estos resultados diferencias entre la especie *Bos taurus* y la subespecie *Bos indicus*.

Diversos autores han encontrado diferencias entre la especie *Bos taurus* y la sub especie *Bos indicus* dentro de las cuales se encuentra la dinámica folicular (Niasari-Naslaji *et al* 1999), la cual es caracterizada por dos o tres ondas foliculares aunque a veces cuatro en el *Bos indicus* (Bó *et al* 2003), también se ha señalado que esta subespecie posee una gran sensibilidad a las gonadotropinas por lo que recluta un mayor número de folículos en una onda folicular que el *Bos taurus* (33 vs 25%, respectivamente) (Baruselli *et al* 2006). A todo esto Greve *et al* (1995) mencionan que una respuesta superovulatoria alta incrementa la producción de embriones de mala calidad.

Por otra parte, existen informes donde se relaciona el diámetro folicular con la calidad embrionaria (Tan y Lu 1990, Machatkova *et al* 2004, Hagemann *et al* 1999, Lonergan *et al* 1994). Se ha establecido que mientras mayor sea el diámetro folicular mejor será la calidad del embrión. Bó *et al* (2003) mencionan que el diámetro folicular de la subespecie *Bos indicus* es menor que el de la especie taurina (6.3mm vs 8.5mm), por lo que se sugiere que los embriones *Bos taurus* son de mejor calidad que los *Bos indicus*.

Apoyando lo anterior se especula, que uno de los factores que podrían influir en la baja calidad embrionaria en el ganado *Bos indicus* es el temperamento,

ya que este no se adapta como el *Bos taurus* a un manejo frecuente de manga, desencadenando situaciones de estrés que alteran o inhiben el pico preovulatorio de LH ocasionando disturbios en la ovulación (Bó y Cutaia 2004) lo que traería como consecuencia una baja calidad del ovocito y por lo tanto del embrión.

Otra diferencia marcada entre estas dos especies es la resistencia al estrés calórico por parte de los embriones *Bos indicus* pero no *Bos taurus* (López *et al* 1995, Hernández-Cerón *et al* 2004, Krininger *et al* 2003). López *et al* (1995) trabajaron ambas especies bajo condiciones de trópico con la finalidad de evaluar la respuesta superovulatoria, encontrando que el *Bos indicus* presenta un mayor número de embriones transferibles que el *Bos taurus* (7.8 ± 4.2 vs 6.6 ± 4.1). De la misma manera, Putney *et al* (1988) reportaron un promedio mayor de embriones recuperados en *indicus* pero embriones de mejor calidad en el *taurus*. En relación a esto, Kanuya *et al* (1997) muestran que la producción de embriones viables de la especie *Bos taurus* en un medio tropical es de (3.3 ± 0.5), indicando que la raza tiene una influencia significativa sobre la calidad de los embriones ya que cuando esta se encuentra en su medio habitual logra un mejor número de embriones transferibles que cuando esta fuera de él.

Krininger *et al* (2003), señalan que los embriones *Bos indicus* son más resistentes a las elevadas temperaturas que los embriones *Bos taurus*, lo que ha llevado a estudiar la ultraestructura de embriones bajo condiciones de estrés calórico. Rivera *et al* (2003), reportan que en embriones *Bos taurus in vivo* recolectados 48 h post inseminación bajo condiciones de estrés calórico (41° C), se observan movimientos de los organelos hacia el centro de los blastómeros, el porcentaje de mitocondrias hinchadas incrementa, así como el número de lisosomas, también se aprecia cómo el citoplasma se llena de vesículas y las membranas del retículo endoplásmico y aparato de Golgi

desaparecen, lo que explica la pérdida de capacidad de los embriones para desarrollarse hasta blastocistos.

Por otra parte, existen reportes donde los embriones provenientes de madres *Bos indicus*, son más difíciles de congelar que los *Bos taurus*. Zanenga (1993) menciona, que el proceso de congelamiento para embriones cebuinos no es igual de satisfactorio como lo es para los taurinos, por lo que sugiere un estudio a nivel ultraestructural de embriones cebú, pues podrían existir algunas diferencias a nivel celular. Para esto Visintin *et al* (2002), evaluaron embriones Nelore (*Bos indicus*) y Holstein (*Bos taurus*) encontrando, que a nivel ultraestructural los embriones Holstein presentan una gran proporción de gotas lipídicas en comparación con el Nelore presentando este último una gran proporción de vesículas con contenidos de diferente electrodensidad que presentan parcialmente material digerido pareciéndose a vacuolas fagosómicas fusionadas con lisosomas secundarios. Contrariamente a estos resultados, en un estudio aún no publicado se compararon las características ultraestructurales de embriones *Bos indicus* (Brahman) VS *Bos taurus* (Holstein) encontrando que la primera especie contiene una mayor proporción de gotas lipídicas que la segunda, estos hallazgos apoyan el informe de Zanenga (1993), sugiriéndose que las gotas lipídicas son la diferencia entre ambas especies a nivel celular, las cuales impiden una congelación exitosa así como mostrando una pobre calidad embrionaria (Abe *et al* 1999, 1999a, 2002, 2002b; Leroy *et al* 2005a, Isachenko *et al* 2001).

De la misma manera, Pegoraro *et al* (2004), evaluaron dos razas diferentes de embriones *Bos taurus* encontrando a nivel ultraestructural que la raza Jersey muestra una mayor proporción de gotas lipídicas que la raza Holstein, lo que indica que los embriones Jersey son más difíciles de congelar que los Holstein, así mismo Pegoraro *et al* (2003), observaron que al congelar los embriones Jersey por el método convencional la mayoría de las membranas pierden su

integridad así como también se observan cristales, los cuales dañan las células lo que explica los bajos porcentajes de sobrevivencia de los embriones Jersey después de ser descongelados convencionalmente. Estos hallazgos indican la influencia que tiene la raza y la variabilidad para la producción de embriones de buena calidad.

Con base en lo anterior Saalfed *et al* (2003), compararon la congelación convencional con la vitrificación concluyendo que el mejor método para criopreservar embriones Jersey (con un contenido alto de gotas lipídicas) es la vitrificación, de la misma manera Pryor *et al* (2007), sugieren a la vitrificación como el mejor método para congelar embriones Brahman, los cuales también son encontrados con un alto contenido de gotas lipídicas.

Todo esto sugiere que la raza definitivamente influye en la calidad embrionaria por lo que es importante identificar la raza de la donadora para de esta manera seleccionar el mejor método de criopreservación ya sea el convencional o la vitrificación.

4.5.3 Edad de la donadora

En diversos estudios han reportado que al aumentar la edad de la donante disminuye el número de ovulaciones, tasa de fecundidad y la calidad embrionaria (Lerner *et al* 1986, Hasler *et al* 1983, Walton y Stubbings 1986).

En la actualidad, con la finalidad de reducir el intervalo entre generaciones se ha implementado el uso de novillas en los programas de transferencia embrionaria con las que se logrará un cambio genético rápido y se obtendrán embriones de mejor calidad.

Existen informes en los que la edad de la donadora influye en la calidad embrionaria positivamente. López *et al* (1995) al evaluar entre vacas y novillas en el trópico no encontraron diferencias en el promedio de embriones recuperados por donadora sin embargo, observaron cierta superioridad de las novillas en el promedio de embriones transferibles, lo que indica que los embriones de las novillas son de mejor calidad. Apoyando estos hallazgos Leroy *et al* (2005b) compararon la calidad embrionaria de novillas VS vacas Holstein encontrando que solo el 13 % de los embriones de vacas fueron categorizados como de buena calidad comparado con el 63% de las novillas. De la misma manera Sartori *et al* (2002) concluyen que los embriones de novillas (11-17 meses de edad) son de mejor calidad que los de vacas.

Por otra parte Leroy *et al* (2005b) encontraron que el factor asociado con la calidad es el color el cual puede ser oscuro o pálido y Leroy *et al* (2005) mencionan que el color oscuro son los que menos resisten a la criopreservación debido a una excesiva acumulación de lípidos. Estos dos estudios concuerdan con que los embriones de vaca presentan una apariencia oscura citoplasmática por lo que concluyen que los embriones de vaca son de menor calidad comparados con los de las novillas. Una posible explicación a estos hallazgos sería que el color esta influenciado tanto por la producción del animal como por su alimentación (Leroy *et al* 2004, 2005, 2005b; Dawuda *et al* 2002, Sartori *et al* 2002).

Sin embargo existen reportes en los cuales la edad influye de manera negativa y esto es cuando se utilizan hembras prepúberes (3 meses de edad) (Gandolfi *et al* 2000, Driancourt *et al* 2001, Holm *et al* 1987) donde la capacidad de desarrollo del ovocito es bajo comparado con el de las vacas (Revel *et al* 1995). Estas diferencias son interpretadas con base a diferencias en los niveles hormonales (Paz *et al* 2001) e incompleta maduración citoplasmática (Mermillod *et al* 1998) lo que pudiera ser corregido con una alta concentración

de FSH (Palma *et al* 2001a). En conclusión, la edad es un factor importante en la calidad embrionaria así como determinante para iniciar una superovulación y por lo tanto la recolección embrionaria.

4.5.4 Época del año

En diversos estudios se ha observado el efecto que tiene la época del año sobre el éxito de la transferencia de embriones. Bastidas y Randel (1987) reportan que la peor época para realizar un trabajo de transferencia de embriones en ganado *Bos indicus* es otoño e invierno mientras que Randel (1984) señala como mejor época al verano.

En relación a embriones transferibles (embriones de buena calidad) Bastidas y Randel (1987) realizaron recolecciones de embriones en dos épocas del año, otoño e invierno obteniendo un promedio de embriones recolectados por donadora de 4.2 y 2.9 respectivamente, estos datos sugieren que el número de embriones recuperado por donadora se ve afectada por la época del año, diferencia que podría deberse a una mayor disponibilidad de alimento. De la misma manera Rutledge *et al* (1999) menciona que los efectos estacionales causan variación en la producción de embriones.

Por otra parte en relación a porcentajes de preñez Shea *et al* (1984) y Bastidas y Randel (1987) reportan bajos porcentajes en la época de invierno comparado con el otoño. Por lo que se sugiere que la mejor etapa para llevar a cabo tanto una recolección embrionaria como la transferencia de estos en ganado *Bos indicus* es la época de lluvias.

Apoyando esto, Márquez *et al* (2005) evaluaron la calidad de los embriones cebú en dos épocas del año (época de secas y época de lluvias) mediante la técnica de Túnel y confirmaron por microscopía electrónica de transmisión

encontrando que los embriones de mejor calidad se recolectan durante la época de lluvias ya que fueron los que se observaron con mejor apariencia morfológica en comparación a los de la época de secas. Estos resultados sugieren que la transferencia de embriones en ganado *Bos indicus* debe realizarse en época de lluvias o proveer a las donadoras y receptoras de una buena alimentación.

Por otra parte Ryan *et al* (1993) y Hasler *et al* (1983) al evaluar a la especie *Bos taurus* observaron que los mejores porcentajes de embriones transferibles (buena calidad) son durante la época fría que calurosa, sugiriendo estos resultados que dependiendo de la especie será la forma en que la época del año afectará o ayudara en la calidad de los embriones.

Además de influir la estacionalidad sobre la calidad embrionaria analizando una etapa anterior también influye sobre el ovocito el cual determina la calidad embrionaria. Zeron *et al* (2001) informan que en Holstein la mejor época para recolectar ovocitos es en invierno con 7.5 por ovario, mientras que en verano sólo se recolectan 5 por ovario. También señalan que en invierno se alcanza un desarrollo más alto de blastocistos que en verano. Estos resultados muestran las diferencias en la capacidad de desarrollo de los ovocitos en diferentes épocas del año. En el ganado *Bos taurus* la mejor época del año es la época de frío.

4.5.5 Calidad del ovocito

La influencia de la calidad del ovocito sobre la calidad embrionaria ha sido reportada en bovinos más que en cualquier otra especie (Sirard *et al* 2006).

La calidad del ovocito ha sido definida como la capacidad de desarrollo hasta blastocisto (Merton *et al* 2003) y ha sido evaluada con base en criterios

morfológicos como el tamaño del folículo, el número de capas de las células de la granulosa y el diámetro del ovocito (Wang y Sun 2007).

En relación al tamaño del folículo existen informes donde muestran que el desarrollo de los ovocitos a blastocistos es alto durante las fases de crecimiento folicular que durante la etapa de dominancia (36 vs 27% respectivamente), sin embargo también muestran que los ovocitos colectados de folículos dominantes (>13mm) producen un mayor número de blastocistos comparados con los que miden de 3 a 8mm (Machatkova *et al* 2004, Hagemann *et al* 1999, Tan y Lu 1990, Lonergan *et al* 1994). Estos hallazgos sugieren que la calidad de ovocito aumenta conforme se incrementa el tamaño folicular.

Por otra parte, la calidad del ovocito también es evaluada por el número de células de la granulosa las cuales van en relación al tamaño del folículo, así los folículos pequeños contienen ovocitos rodeados de 2 ó 4 capas (Sirard *et al* 2006) mientras que los grandes de 5 capas. Bilodeau-Goeseels y Panich (2002) clasificaron a los ovocitos en seis clases de acuerdo al número de capas de las células de la granulosa y a la textura de su citoplasma. **Clase I** ≥ 5 capas de la células de la granulosa (CG) y textura homogénea en el citoplasma. **Clase II** ≥ 5 CG y ligera granulación del citoplasma. **Clase III** < 5 CG y citoplasma homogéneo. **Clase IV** < 5 CG y citoplasma granulado. **Clase V** 0 CG citoplasma variable y **clase VI** ≥ 1 CG con citoplasma granulado. Al evaluar los porcentajes obtenidos de blastocistos en cada clase, encontraron que los mejores porcentajes se obtienen de los ovocitos con mas de 5 capas.

Otro criterio que se toma en cuenta para la calidad del ovocito es su tamaño, ya que en folículos primordiales mide $30\mu\text{m}$ y aumenta en folículos antrales (10-15mm) hasta $130\mu\text{m}$ (Greve y Callesen 2005, Merton *et al* 2003) donde la premaduración y maduración del ovocito ha ocurrido, la cual es crucial para la calidad (Merton *et al* 2003). Arlotto *et al* (1996) determinaron que los ovocitos

con un diámetro $\geq 115\mu\text{m}$ son los que normalmente llegan a estado de blastocisto comparado con los chicos.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si los criterios de clasificación por microscopía estereoscópica son eficientes para embriones de ganado *Bos taurus* al ser evaluados por microscopía electrónica.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el nivel de concordancia entre los métodos de evaluación microscópica.

5.3 HIPÓTESIS

Los criterios de clasificación de embriones *Bos taurus* por medio del microscopio estereoscópico concuerdan con la evaluación de microscopía electrónica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 FASE DE CAMPO

Esta primera fase se realizó en el estado de Aguascalientes situado a N 28° 28', S 21° 37', E 101° 51', O 102°53' (Gobierno de Aguascalientes, 2004), en el rancho “La Escondida” donde se llevó a cabo la sincronización, superovulación y recolección embrionaria.

Para tal fin, se utilizaron 10 vaquillas de la raza Holstein (*Bos taurus*) sometiéndolas a examen reproductivo con la finalidad de verificar que no presentaran alteraciones anatómicas que interfirieran con la fertilidad.

Previo a la superovulación las vaquillas fueron sincronizadas con la finalidad de determinar el calor base (día cero), a partir del cual se contaron 10 días para iniciar el tratamiento superovulatorio. La sincronización consistió en la administración de dos aplicaciones de 100µg de GnRH (Ovalyse, Pfizer México) separadas por un intervalo de 7 días. Posteriormente al día 14 se aplicaron 25mg de PGF2α (Lutalyse; Pfizer México) llevándose a cabo la detección continua de calores. La superovulación fue iniciada al día 10 del ciclo estral, administrándose una cantidad total de 280mg FSH-P1 (Folltropin-V® BIONICHE) a dosis decrecientes, durante cuatro días. A las 72 horas de iniciada la superovulación, se administraron dos dosis de 25mg de PGF2α con un intervalo de 12 horas entre cada aplicación, con la finalidad de inducir el celo; una vez detectado este, se inseminaron con semen Brahman a las 12 y 24 horas (Roelofs *et al* 2006), realizándose la recolección embrionaria al séptimo día después de la primera inseminación artificial por el método no quirúrgico citado por Elsdén *et al* (1976). Una vez terminada la recolección a las hembras donadoras se les administraron 25mg de prostaglandina con la finalidad de provocar la lisis de los cuerpos lúteos (cuadro 1).

PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN Y SUPEROVULACIÓN		
FECHA	HORARIO	
DÍA	Sincronización	
1	GnRH 100µg	
7	GnRH 100µg	
14	PGF2α 25mg	
17 (estro=día cero)	Detección de celos	
Superovulación		
	AM	PM
10	50mg FSH	50mg FSH
11	40mg FSH	40mg FSH
12	30 mg FSH + 25mg PGF2α	30mg FSH + 25mg PGF2α
13	20mg FSH	20mg FSH
14	Detección de celos e inseminación.	
15		
22	Recolección de Embriones 8:00 AM	

Cuadro 1. Esquema del tratamiento superovulatorio.

6.2 FASE DE LABORATORIO

Los embriones fueron clasificados utilizando un microscopio estereoscópico (Stereo Zomm®6) donde la búsqueda se realizó a un aumento de 15x y la evaluación a 60x, de acuerdo los criterios citados por Robertson y Nelson (1998) en el Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

Criterios de calidad para microscopía estereoscópica

CALIDAD 1: Excelente o bueno. Corresponde a aquellos embriones con una masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros uniformes en talla, color y densidad. Estos embriones coinciden con el estado de desarrollo esperado. Las irregularidades deben ser relativamente menores y al menos el 85% del

material celular debe ser una masa embrionaria viable e intacta. La superficie de la zona pelúcida debe ser lisa y no cóncava.

CALIDAD 2: Regular. Moderadas irregularidades tanto en la forma de la masa embrionaria como en tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta y viable.

CALIDAD 3: Pobre o mala. Mayores irregularidades en la forma de la masa embrionaria, tamaño, color y densidad. Al menos 25% del material celular debe estar intacto y viable.

CALIDAD 4: Muerto o degenerado. Embriones degenerados, ovocitos o embriones de 1 célula: no viables.

Una vez clasificados los embriones de acuerdo a su calidad, fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión, procediendo a la fijación por inmersión en fijador de Karnovsky modificado pH 7.4 el cual contenía glutaraldehído 2.5 % y paraformaldehído 1.0% (Karnovsky, 1965) manteniéndolos durante 30 minutos; posteriormente fueron lavados en solución amortiguadora a base de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4, transportándolos al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Posteriormente se llevó a cabo la post fijación con tetraóxido de osmio al 1 % durante una hora. Después se realizó la deshidratación de las muestras en alcohol etílico a través en una serie de concentraciones ascendentes (70, 80, 90, 95 y 100%), permaneciendo por un lapso de 20 minutos en cada una, realizándose finalmente la infiltración en EPON 812 (Pelco Internacional, México), comenzando por colocar las muestras en acetonitrilo, con dos cambios de 20 minutos y después en diluciones de resina 1:1 (acetonitrilo en relación a EPON) y 2:1 cada una con un tiempo de una hora, y después en EPON puro donde permanecieron por 24 h a

temperatura ambiente. Finalmente las muestras se incluyeron en EPON en moldes y se polarizaron en una estufa a 60° C durante 24 horas.

Una vez terminado el proceso, se realizaron cortes semifinos (1 μ) del embrión en el ultra micrótomo LKB (NOVA) los cuales fueron teñidos con azul de Toluidina al 0.5% analizándose al microscopio de luz con la finalidad de determinar el nivel en el cual se deben de realizar los cortes finos, y además se aprovechó para clasificar nuevamente los embriones utilizando los mismos criterios que para microscopía estereoscópica.

Posteriormente, se obtuvieron cortes finos (50-70 nm), contrastándolos con acetato de uranilo y citrato de plomo, los cuales fueron montados en rejillas de cobre de 100 mesh para su revisión ultraestructural en el microscopio electrónico de transmisión (Jeol Jem 1010, 60KV) de acuerdo a criterios que se establecieron basados en resultados encontrados por Abe *et al* (1999) y Abe *et al* (2002).

Criterios de clasificación para microscopía electrónica de transmisión

Calidad 1 ó buenos: Este grupo de embriones presenta la zona pelúcida intacta. El espacio perivitelino se encuentra libre de detritus celulares y/o blastómeros extruídos.

Las células del trofoblasto presentan abundantes proyecciones citoplasmáticas dirigidas hacia el espacio perivitelino y que corresponden a microvellosidades; que dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentre el embrión serán cortas (mórula) o largas (blastocisto). A nivel del citoplasma las células del trofoblasto se caracterizan por presentar una ligera electrodensidad en comparación de las células de la masa celular interna. En relación a los organelos se observan abundantes mitocondrias de forma redonda y/o alargada con las crestas muy abundantes, tanto el aparato de Golgi como el retículo endoplásmico se encuentran bien definidos, los ribosomas se

presentaron como gránulos oscuros, los lisosomas secundarios son poco abundantes, existen escasos fagosomas (relacionado con la apoptosis) y también pocas gotas lipídicas. Entre las células del trofoblasto se observan largos y numerosos complejos de unión como desmosomas y las uniones ocluyentes.

Las células de la masa celular interna presentan los mismos organelos pero en menor cantidad, no están polarizadas (sin microvellosidades) y el tipo de unión que mas se observa son las comunicantes.

Calidad 2 o regulares: la zona pelúcida se observa intacta, en el espacio perivitelino pueden presentarse en algunas ocasiones detritus celulares y/o blastómeros extruídos. Estos últimos son esféricos, sin microvellosidades y en su citoplasma contienen numerosas vesículas y gotas lipídicas. A nivel celular es difícil distinguir entre los dos tipos de células por su densidad citoplasmática. Las células del trofoblasto presentan menos microvellosidades que las vistas en los embriones de buena calidad. Internamente se aprecia el núcleo de forma redonda con su envoltura nuclear bien definida así como cúmulos de cromatina densa y en algunas ocasiones es posible observar vacuolas intracitoplasmáticas. También se observan diversos organelos como mitocondrias redondas y/o alargadas cuyas crestas son escasas e inclusive algunas mitocondrias pueden estar vacuoladas, el aparato de Golgi es escaso mostrando signos de poca actividad, el retículo endoplásmico en su mayoría es liso y poco abundante, existe la presencia de ribosomas libres, gránulos oscuros, los lisosomas secundarios son abundantes, existe moderada proporción de fagosomas y una cantidad mayor de vesículas y gotas lipídicas todo ello en comparación con los de buena calidad. Las uniones presentes en este tipo de células son las uniones de tipo ocluyente y desmosomas, sin embargo se observan en menor cantidad y no tan largos como los de buena calidad.

Las células de la masa celular interna presentan los mismos organelos que las células anteriores pero en menor proporción, el tipo de unión entre ellas es comunicante y están desprovistas de microvellosidades.

Calidad 3 o malos: la zona pelúcida se observa intacta, en el espacio perivitelino se encuentra abundante presencia de detritus celulares así como blastómeros extruídos. A nivel celular no se logran distinguir diferencias en la densidad citoplasmática entre los dos tipos de células. Las células del trofoblasto presentan muy pocas microvellosidades o inclusive pueden estar ausentes. Internamente se aprecia el núcleo con la envoltura nuclear en algunos casos poco perceptible y el nucleolo vacuolado. Las células del trofoblasto presentan diversos organelos como mitocondrias de forma redonda y/o alargada con crestas escasas y vacuoladas, el aparato de Golgi es difícil de identificar, el retículo endoplásmico también es escaso, los lisosomas secundarios son abundantes así como también los fagosomas, vesículas y gotas lipídicas. Los complejos de unión no se encuentran definidos.

Las células de la masa celular interna presentan los mismos organelos que las células del trofoblasto pero en menor proporción, el tipo de unión entre ellas es comunicante y están desprovistas de microvellosidades.

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva, calculándose los porcentajes de embriones por categoría (buena, regular y mala) para los tres métodos de evaluación (microscopía estereoscópica, microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión).

Para determinar la correlación que existe entre microscopía estereoscópica y microscopía de luz así como microscopía estereoscópica y microscopía electrónica de transmisión se utilizó la prueba de Kappa de Cohen.

VII. RESULTADOS

7.1 RESPUESTA SUPEROVULATORIA

De 86 cuerpos lúteos encontrados por palpación rectal se encontró un total de 69 embriones, clasificados de la siguiente manera: 32 embriones de buena calidad (46.4 %), 16 embriones de calidad regular (23.2%), 12 embriones de mala calidad (17.4%) y 9 embriones muertos, degenerados o sin fertilizar (13%). En el cuadro 2 se observan la respuesta superovulatoria y el número de embriones distribuidos de manera individual.

Novillas	No. CL	Calidad 1	Calidad 2	Calidad 3	Calidad 4	Relación No. CL/ No. Embrión (%)
1	3 CL	----- -	2	-----	-----	66
2	11 CL	4	4	10	1	136
3	12 CL	4	1	2	2	75
4	7 CL	3	1	-----	-----	57
5	15 CL	6	-----	-----	1	46.6
6	4 CL	3	2	-----	1	150
7	9 CL	7	1	-----	-----	88.8
8	7 CL	4	1	-----	3	114
9	10 CL	1	4	-----	-----	50
10	8 CL	----- -	-----	-----	1	12.5
Total	86 CL	32	16	12	9	795.9
Promedio	8.6	3.2	1.6	1.2	0.9	79.59
Gral.	CL					

Cuadro 2. Clasificación de embriones de acuerdo a su calidad y relación entre el número de cuerpos lúteos encontrados y número de embriones recuperados.

7.2 EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES POR MICROSCOPIA ESTEROSCÓPICA.

Los embriones clasificados por este método concordaron con el estado de desarrollo esperado y con el día en que se realizó la recolección, encontrándose un 3% en mórulas tempranas, 23% de mórulas compactas, 13% de blastocistos tempranos, 23% de blastocistos maduros y 37% de blastocistos expandidos.

Para este estudio se seleccionaron 10 embriones por cada categoría (Cuadro 3) en donde los embriones de buena calidad se caracterizaron por presentar blastómeros compactados y a la vista una forma poligonal así como un tamaño uniforme y simétrico. Los embriones asignados en la calidad de regular presentaron moderadas irregularidades en la forma de la masa embrionaria y finalmente los embriones de calidad 3 presentan irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria así como también blastómeros de diferentes tamaños los cuales se apreciaron sueltos. En las tres categorías la zona pelúcida (ZP) se observó intacta y libre de irregularidades. (Figura 5).

7.3 EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES POR MICROSCOPIA DE LUZ.

Una vez hechos los cortes semifinos se realizó la observación de los embriones por microscopia de luz mediante los criterios citados por Robertson y Nelson (1998) en el Manual de la IETS, encontrando un 33% (10) para buenos, 30% (9) para regulares y 37% (11) malos (Cuadro 3).

En cuanto a las características morfológicas, los embriones de buena calidad presentaron una zona pelúcida intacta; el espacio perivitelino fue continuo y libre de blastómeros extruídos; los blastómeros de la masa compacta de células se observaron fuertemente unidos y con un arreglo homogéneo y

uniforme entre si, lográndose apreciar la presencia de los dos tipos celulares (células del trofoblasto y masa celular interna) (Figura 6).

En la figura 7 se puede observar un embrión clasificado como calidad 2 por microscopía estereoscópica y que correspondió a calidad 3 al ser evaluado por microscopía de luz, en él se muestra su zona pelúcida intacta y en el interior blastómeros de diferentes tamaños con núcleos esféricos, observándose en el espacio perivitelino blastómeros extruídos.

En la figura 8 se puede apreciar un embrión clasificado como calidad 3 por MEst pero calidad 2 por ML.

Los embriones clasificados como calidad 3 presentan su zona pelúcida intacta, en el espacio perivitelino algunos blastómeros extruídos y en la masa celular interna se observan blastómeros unidos de diferentes tamaños (figura 9).

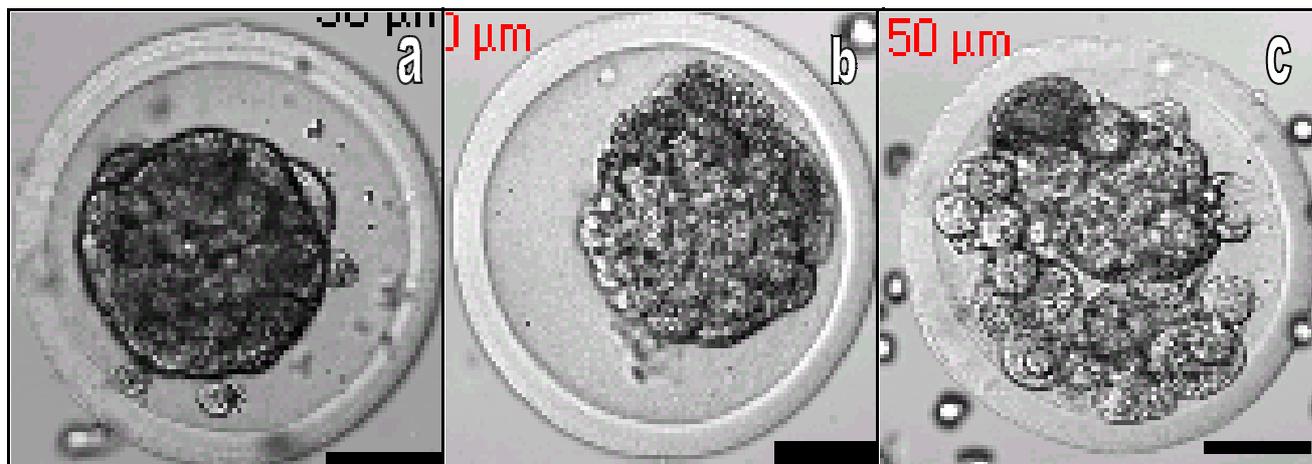


Figura 5. Fotografías al microscopio estereoscópico de la clasificación de los embriones bovinos. a) Embrión de buena calidad, b) embrión de regular calidad y c) embrión de mala calidad. Barra 50µ

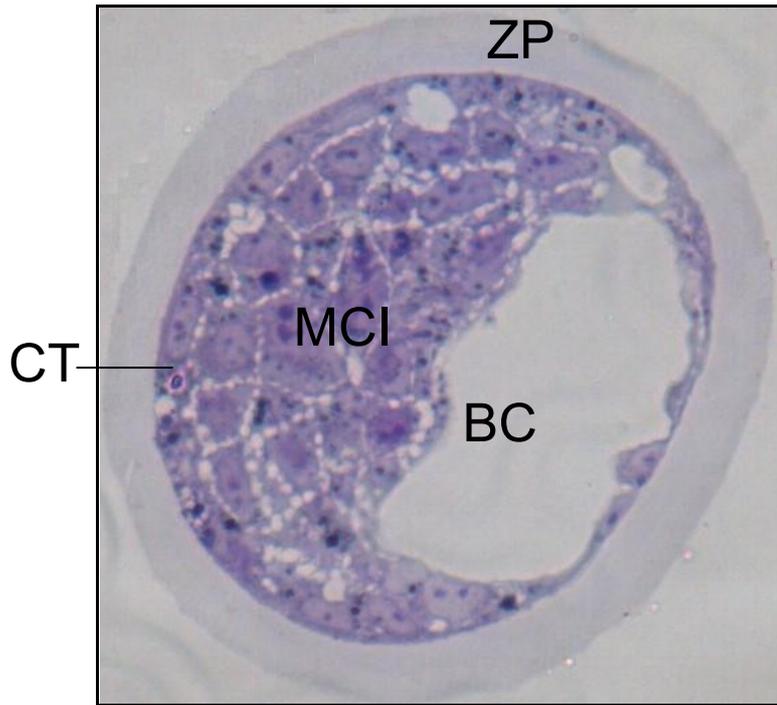


Figura 6. Microfotografía del corte semifino de un blastocisto clasificado como calidad 1. Por debajo de la zona pelúcida (ZP) se observa una capa de células ovoides aplanadas con núcleo oval correspondientes a las células del trofoblasto (CT). Adyacentes a las anteriores en el polo superior se encuentran células poliédricas irregulares de diferentes tamaños con núcleos bien definidos, correspondientes a las células de la masa celular interna (MCI). En el polo opuesto se observa una cavidad, la cual corresponde al blastocelo (BC). Este corte concordó con la clasificación dada a este mismo embrión con el microscopio estereoscópico. Tinción azul de toluidina, aumento: 400x

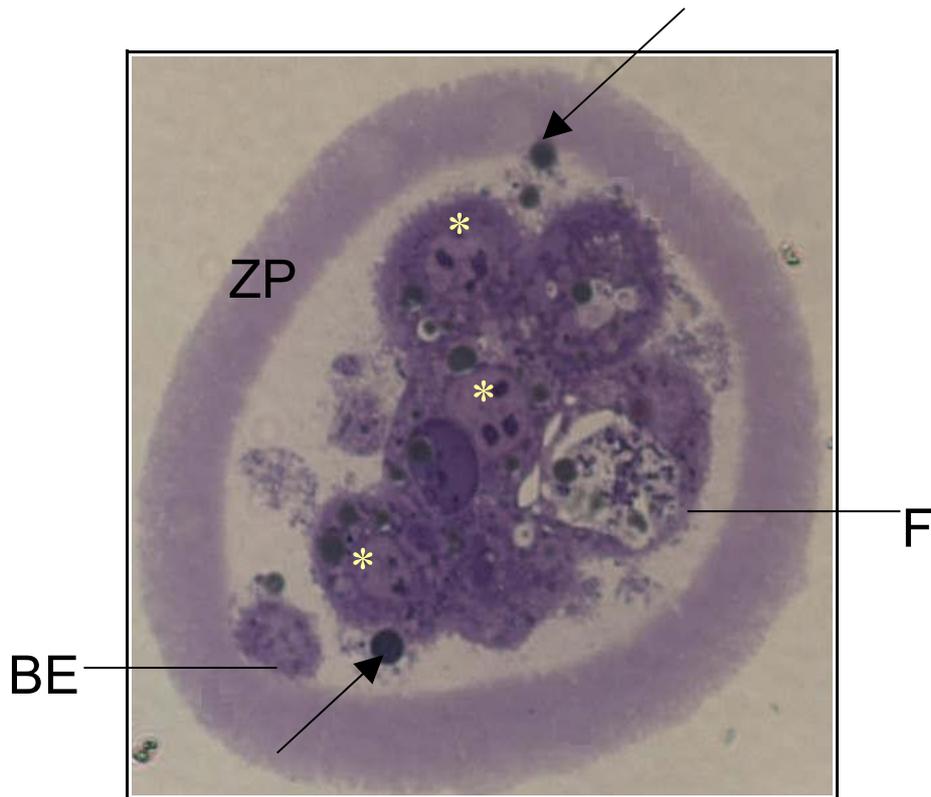


Figura 7. Macrofotografía de un corte semifino de una mórula clasificada como calidad 3. Externamente se observa la ZP intacta, el espacio perivitelino se muestra ocupado por blastómeros extruídos (BE) y al centro se observa un cúmulo de células no identificables con su núcleo bien definido (*). En uno de los blastómeros se puede apreciar un fagosoma (F). Este corte no concordó con la clasificación dada a este mismo embrión con el microscopio estereoscópico (calidad 2). Las flechas señalan algunos artefactos producto de la tinción. Tinción azul de toluidina. 400x

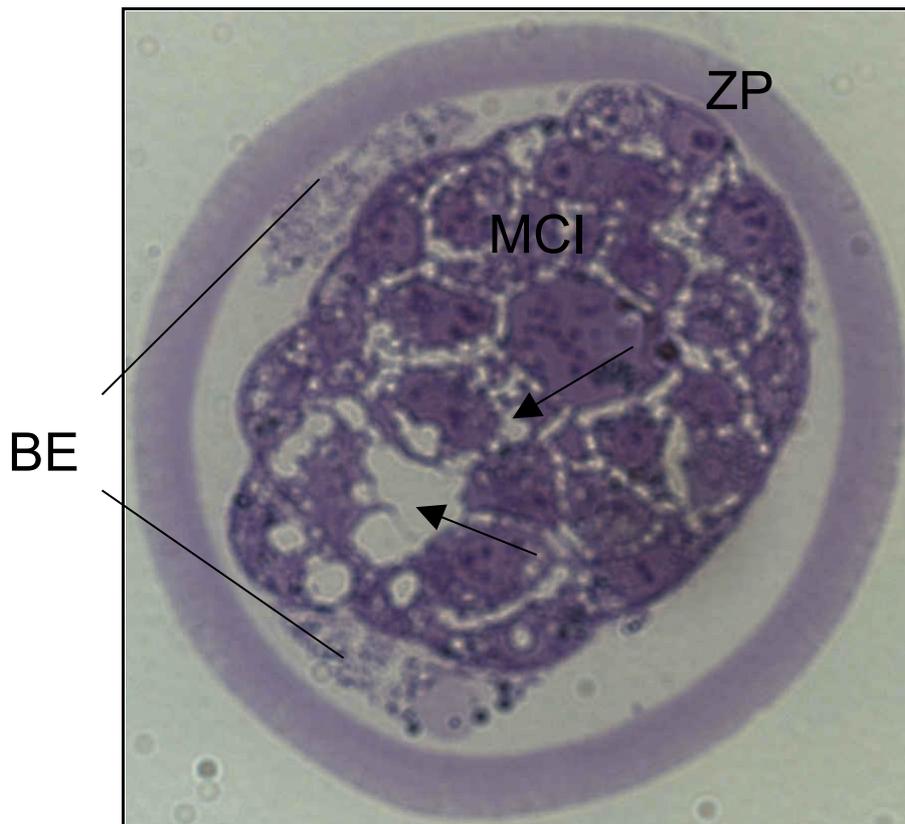


Figura 8. Microfotografía de un corte semifino de una mórula compacta clasificada como calidad 2. Externamente se observa la ZP intacta. En el espacio perivitelino se observan blastómeros extruídos (BE). En el centro de la mórula se observa un cúmulo de células en el cual se identifican dos tipos de células: i) células de forma ovoide que corresponden a las células del trofoblasto (CT) y ii) células de forma poliédrica irregular las cuales representan las células de la masa celular interna (MCI) con sus núcleos bien delimitados; entre las células se observan espacios intercelulares (flechas) los cuales formaran una cavidad conocida como blastocele. Este corte no concordó con la clasificación dada a este mismo embrión con el microscopio estereoscópico (calidad 3). Tinción azul de toluidina, 400x

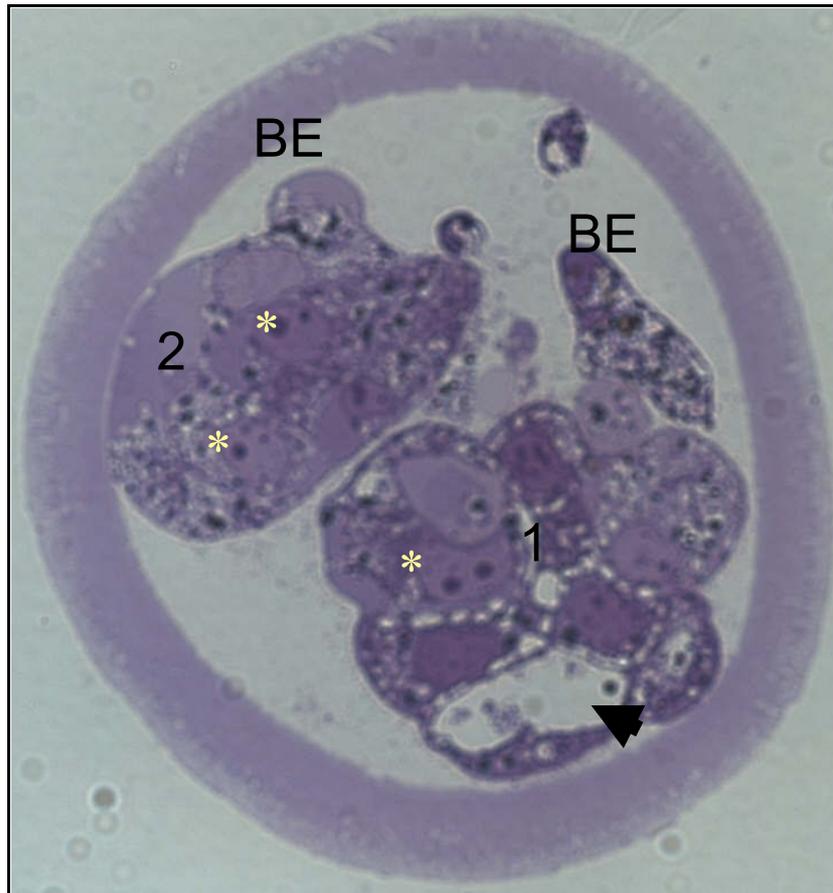


Figura 9. Microfotografía de un corte semifino de una Mórula temprana clasificada como calidad 3. Externamente se observa la zona pelúcida (ZP) intacta. En el espacio perivitelino se aprecian dos grupos de células. El primer grupo (1), esta situado próximo al polo inferior apreciándose poca cohesión entre las células, observándose además una pequeña cavidad (cabeza de flecha). El segundo grupo (2) de células esta situado en el polo superior del embrión y se observan células compactas con sus núcleos (*) bien definidos. En ambos grupos se observan células extruyéndose (BE). Este corte concordó con la clasificación dada a este mismo embrión con el microscopio estereoscópico (calidad 3). Tinción azul de toluidina, 400x.

	BUENO	REGULAR	MALO	TOTAL
M Est	10 (33%)	10 (33%)	10 (33%)	30
ML	10 (33%)	9 (30%)	11 (37%)	30
MET	14(47%)	6 (20%)	10 (33%)	30

Cuadro 3. Porcentajes de embriones clasificados en las diferentes calidades (buenos, regulares y malos) de acuerdo al microscopio empleado. **M Est**= microscopio estereoscópico; **ML**=microscopio de luz y **MET**= microscopio electrónico de transmisión.

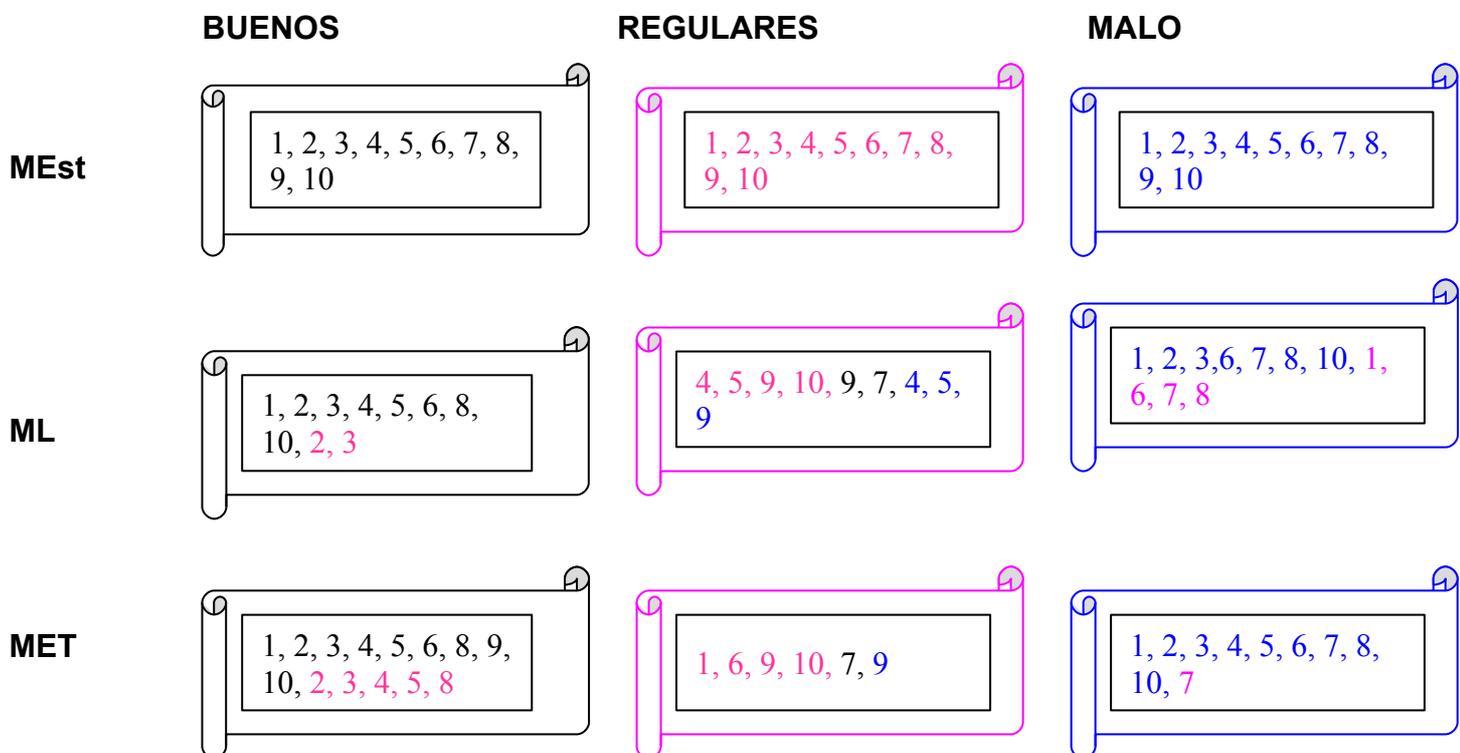


Figura 10. Se muestra la forma en que ocurrieron los cambios por embrión, calidad y método utilizado en la clasificación, teniendo en cuenta que cada embrión tiene su número y cada calidad su color. **MEst**, microscopía estereoscópica; **ML**, microscopía de luz; y **MET**, microscopía electrónica de transmisión.

7. 4 EVALUACIÓN DE EMBRIONES POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Ultraestructuralmente los resultados fueron los siguientes: embriones de buena calidad 47% (14), regulares 20% (6) y malos 33% (10). En el cuadro 3 y en la figura 11 se observan los cambios de calidad de los embriones al ser clasificados por las diferentes técnicas microscópicas.

En relación a las características ultraestructurales todos los embriones presentan externamente una zona pelúcida intacta, porosa (Figura 11). Los de calidad 1 presentaron una clara diferencia entre las células del trofoblasto y masa celular interna, siendo las primeras de forma alargada con proyecciones largas y abundantes hacia el espacio perivitelino que corresponden a las microvellosidades (Figura 11 y 12), así mismo, presentaron un núcleo alargado con la cromatina compactada a la periferia. Las células de la masa celular interna fueron de forma poliédrica irregular y con núcleos bien delimitados (figura 14). En relación a los tipos de unión observados entre las células del trofoblasto se encontraron, los desmosomas y uniones oclusivas (figura 12 y 13). En el citoplasma se apreciaron mitocondrias de forma redonda y/o alargada con crestas abundantes (figura 15) y lisosomas secundarios poco abundantes.

Los embriones de regular calidad presentan sobre su superficie de las células del trofoblasto, un menor número de microvellosidades en comparación al grupo anterior; en el citoplasma se aprecian gotas lipídicas, detritus celulares, mayor cantidad de lisosomas secundarios, mitocondrias con discretas crestas y fagosomas (figuras 16 y 17).

Finalmente los embriones de mala calidad presentaron en la superficie de las células del trofoblasto escasas microvellosidades; el citoplasma presento una

mayor proporción de gotas lipídicas, lisosomas secundarios y fagosomas. En el interior del núcleo se aprecian nucleolos con patrón fibrilar (figura 18).

7.5 COMPARACIÓN ENTRE LAS EVALUACIONES

En el cuadro 3, se presentan los porcentajes de los embriones considerados en las diferentes categorías al evaluarse mediante los tres diferentes microscopios. Como puede apreciarse el porcentaje de los embriones de buena calidad aumentó del 33% al 47% cuando fueron evaluados por microscopía electrónica, mientras que los embriones regulares disminuyeron de 33 a 20% ya que parte de ellos cambiaron de calidad principalmente a buenos, mientras que los embriones de mala calidad, continuaron con el mismo porcentaje (33%), sin embargo se observaron cambios de calidad como se muestra en la figura 10.

En la figura 19 se observa un blastocisto clasificado por microscopía estereoscópica como calidad 1 y que al ser evaluado por microscopía electrónica de transmisión las características ultraestructurales indicaron que la clasificación fue la adecuada.

Un ejemplo de la imprecisión en la evaluación se observa en la figura 20 donde una mórula clasificada como calidad 2 al ser evaluada por medio de la microscopía electrónica cambio a calidad 1.

7.6 CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN

Para la determinación de concordancia entre los métodos de evaluación de microscopía estereoscópica con microscopía de luz; y microscopía estereoscópica con microscopía electrónica de transmisión se utilizó la prueba de Kappa de Cohen, donde la concordancia fue determinada de acuerdo al siguiente cuadro.

VALOR k	NIVEL DE CONCORDANCIA
<0.20	POBRE
0.21-0.40	REGULAR
0.41-0.60	MODERADO
0.61-0.80	BUENA
0.81-1	MUY BUENA

El valor de k entre los métodos de microscopía estereoscópica y microscopía de luz fue: **0.44**. El valor de k para los métodos de microscopía estereoscópica y microscopía electrónica de transmisión fue de **0.59**, existiendo entre ambos métodos moderada concordancia.

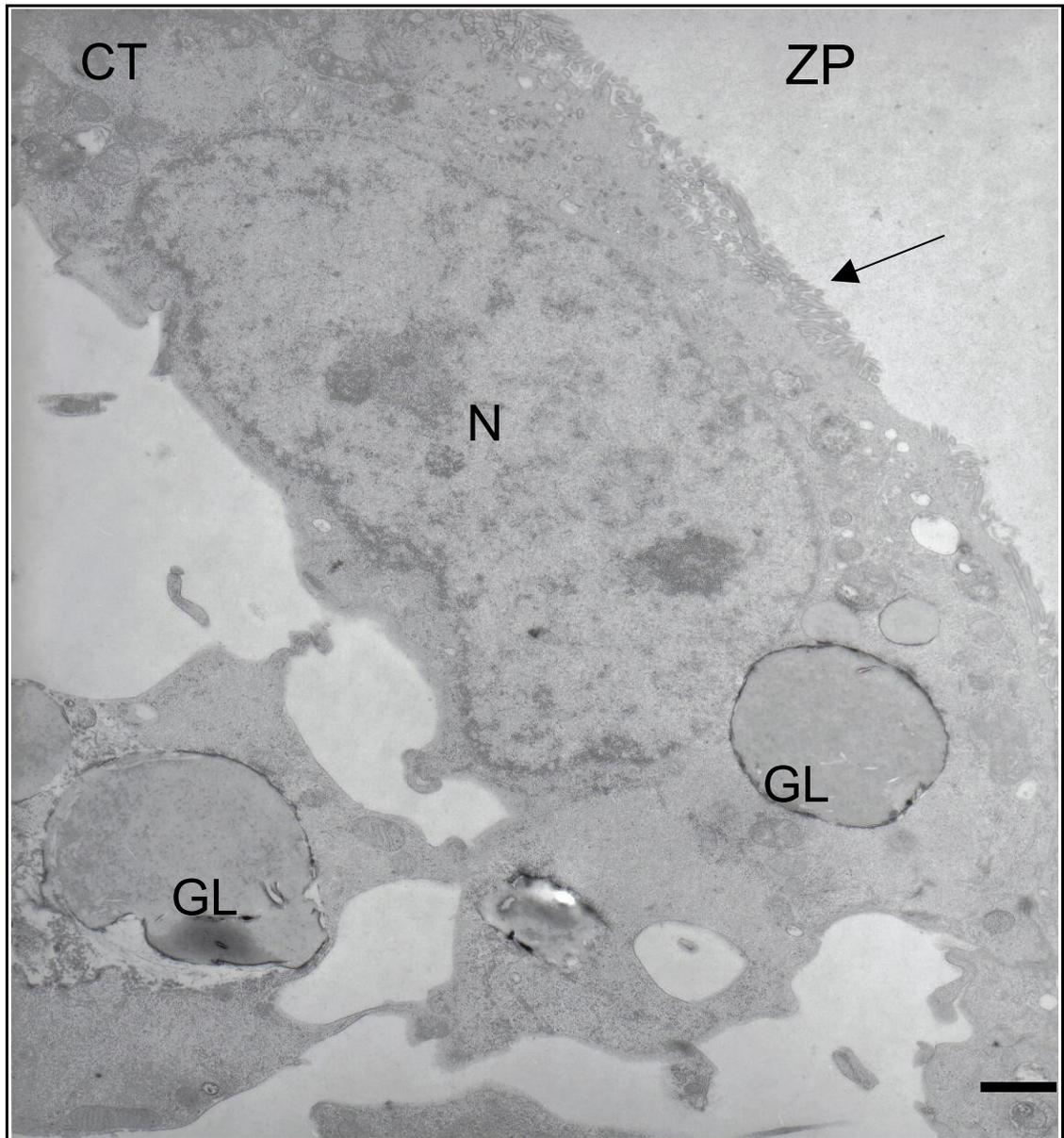


Figura 11. Microfotografía electrónica de un blastocisto clasificado como calidad 1. En la parte superior derecha se observa un área con aspecto granular fino que representa la zona pelúcida (ZP), adyacente a ella se aprecia una célula de forma ovoide correspondiente a las células del trofoblasto (CT), la cual presenta su núcleo (N) de la misma forma (ovoide) y en su membrana plasmática se aprecian microvellosidades (flecha). En el citoplasma se observan posibles gotas lipídicas (GL). Barra: 1µm

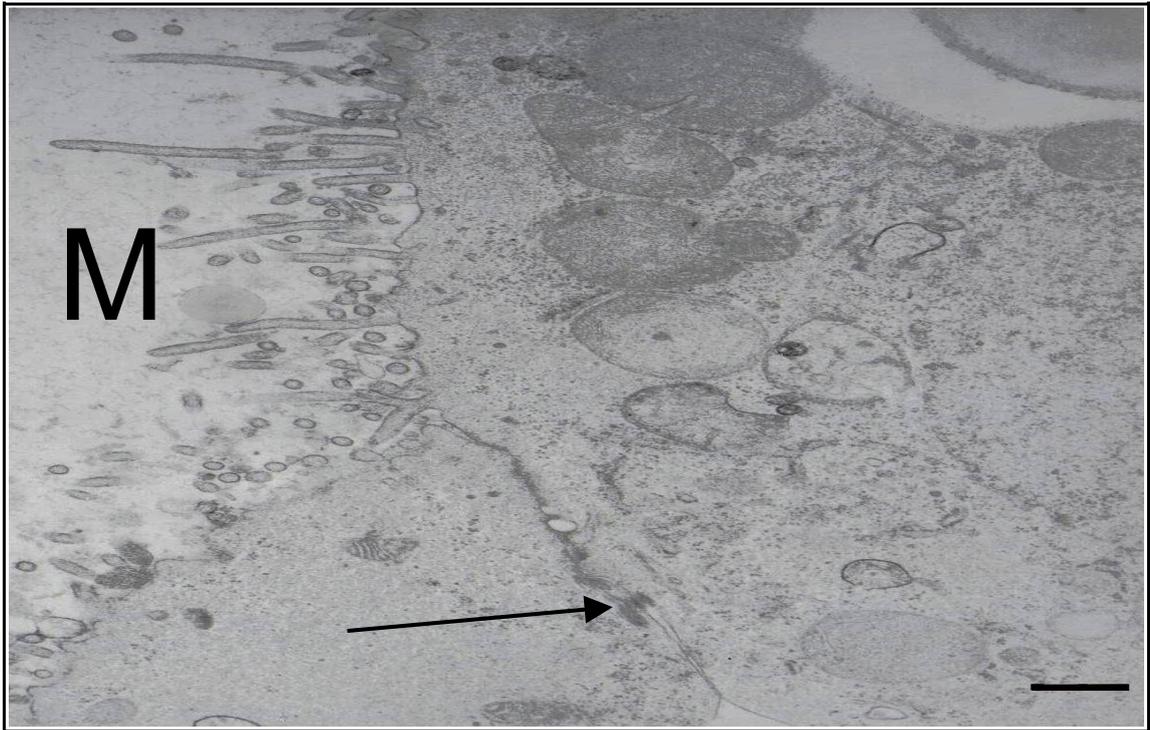


Figura 12. Microfotografía electrónica de una célula del trofoblasto calidad 1. Sobre la superficie es posible observar microvellosidades (M) las cuales son proyectadas hacia el espacio perivitelino así como también se observan diversos puntos de unión entre células como son los desmosomas (flecha). Barra: 500 μ m.

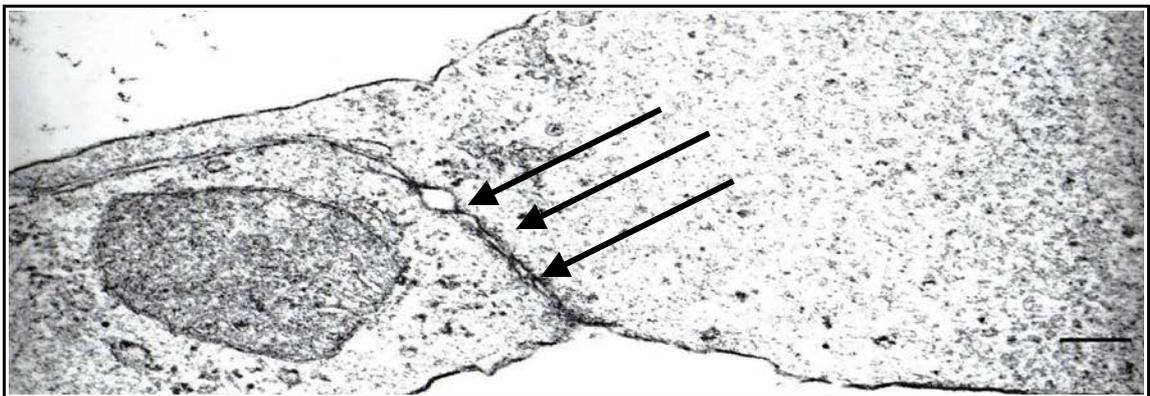


Figura 13. Microfotografía electrónica de un acercamiento de un complejo de unión entre las células del trofoblasto (flecha). Barra 200nm.

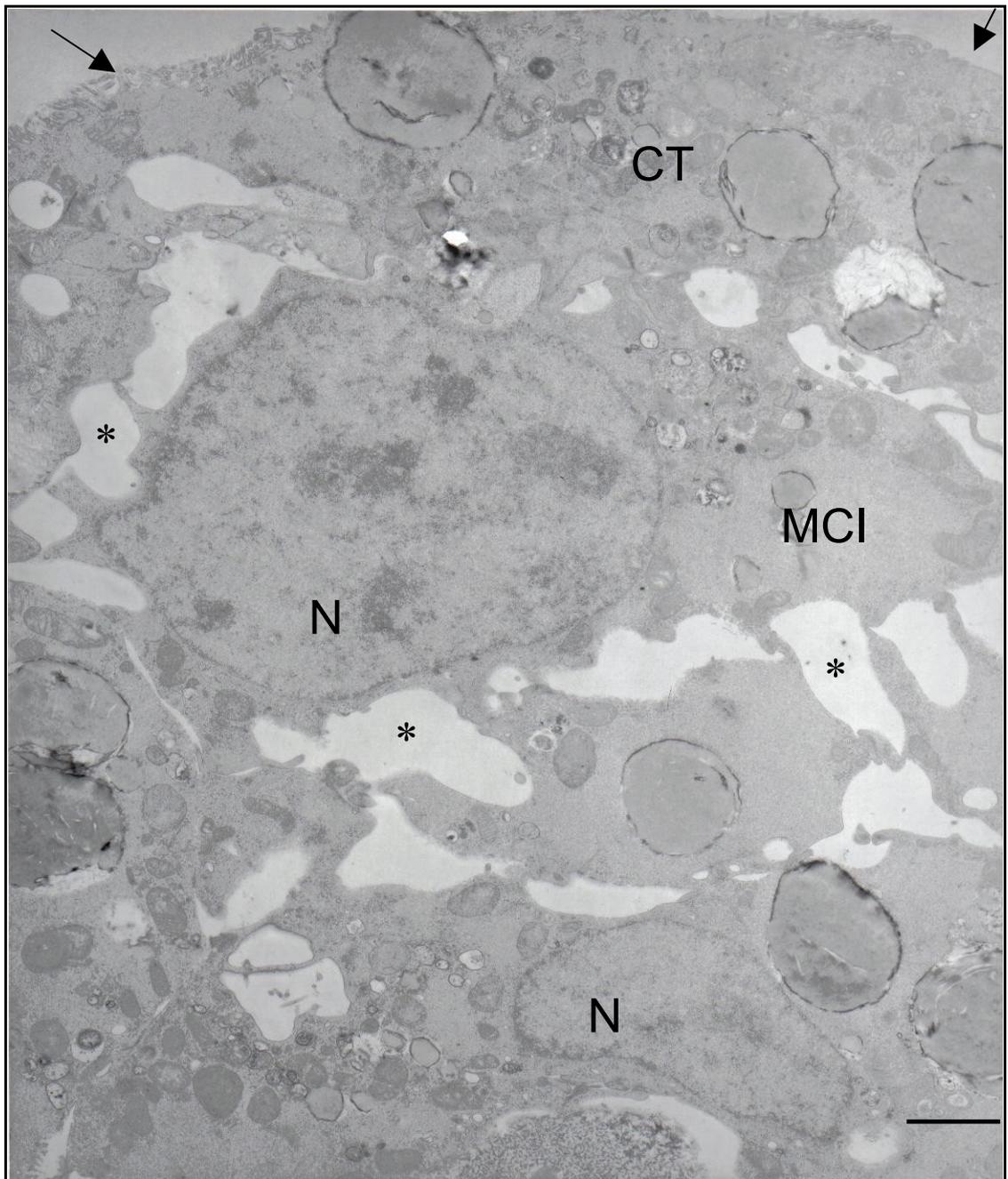


Figura 14. Microfotografía electrónica de un blastocisto calidad 1. En la parte superior se observa una célula del trofoblasto (CT) identificada por las microvellosidades (flecha) que son dirigidas hacia el espacio perivitelino; subyacente a ella se aprecian células de la masa celular interna (MCI) de forma poliédrica irregular, identificadas por la forma característica de sus núcleos (N) y por la presencia de los espacios intercelulares (*). Barra 2 μ .

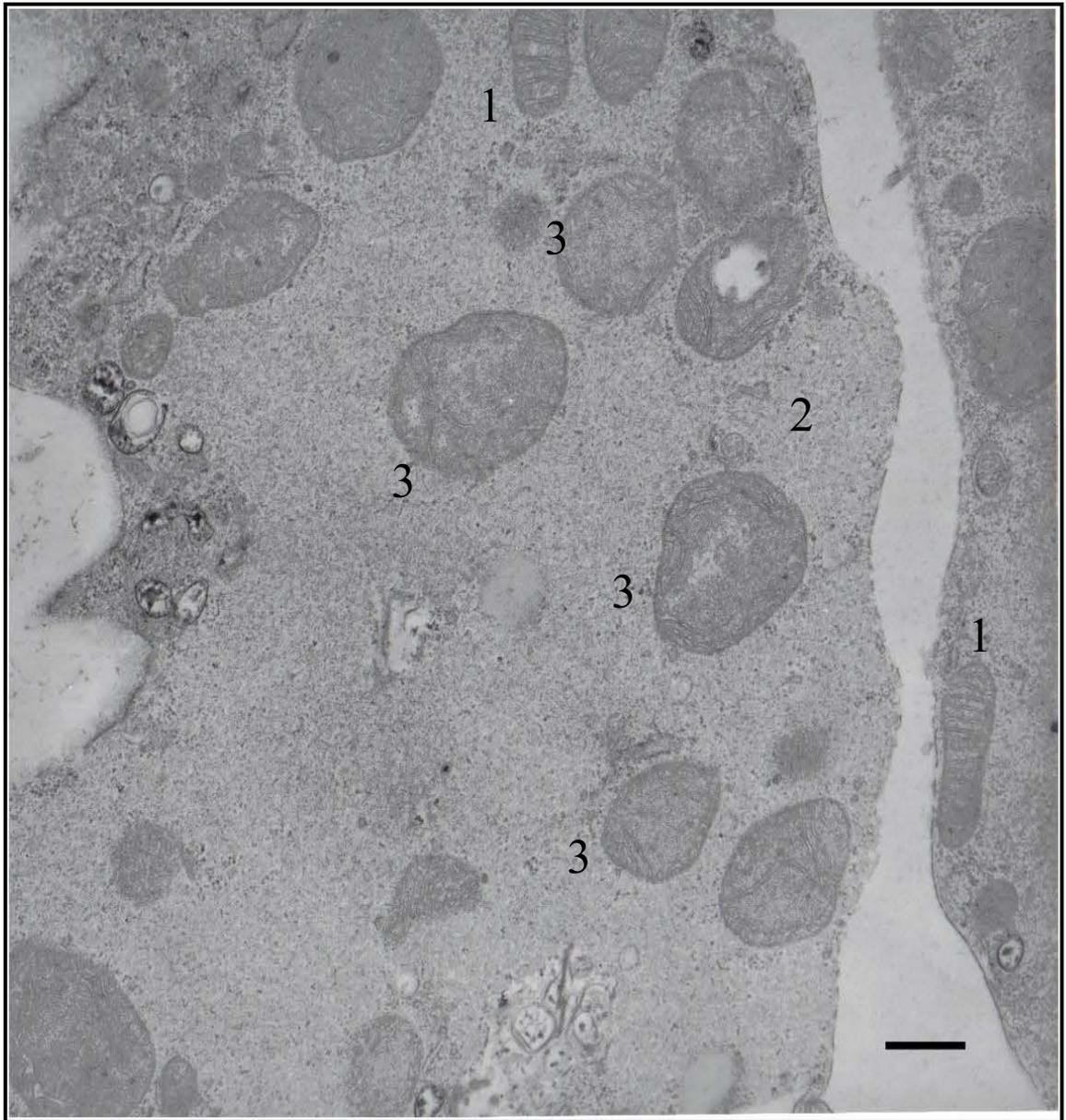


Figura 15. Microfotografía electrónica de las células de la masa celular interna. Se muestran los tres tipos de mitocondrias que pueden ser encontrados en los embriones: mitocondria alargada con abundantes crestas (1), mitocondrias vacuoladas (2) y mitocondrias de forma ovoide con pocas de crestas (3). Barra: 500µm

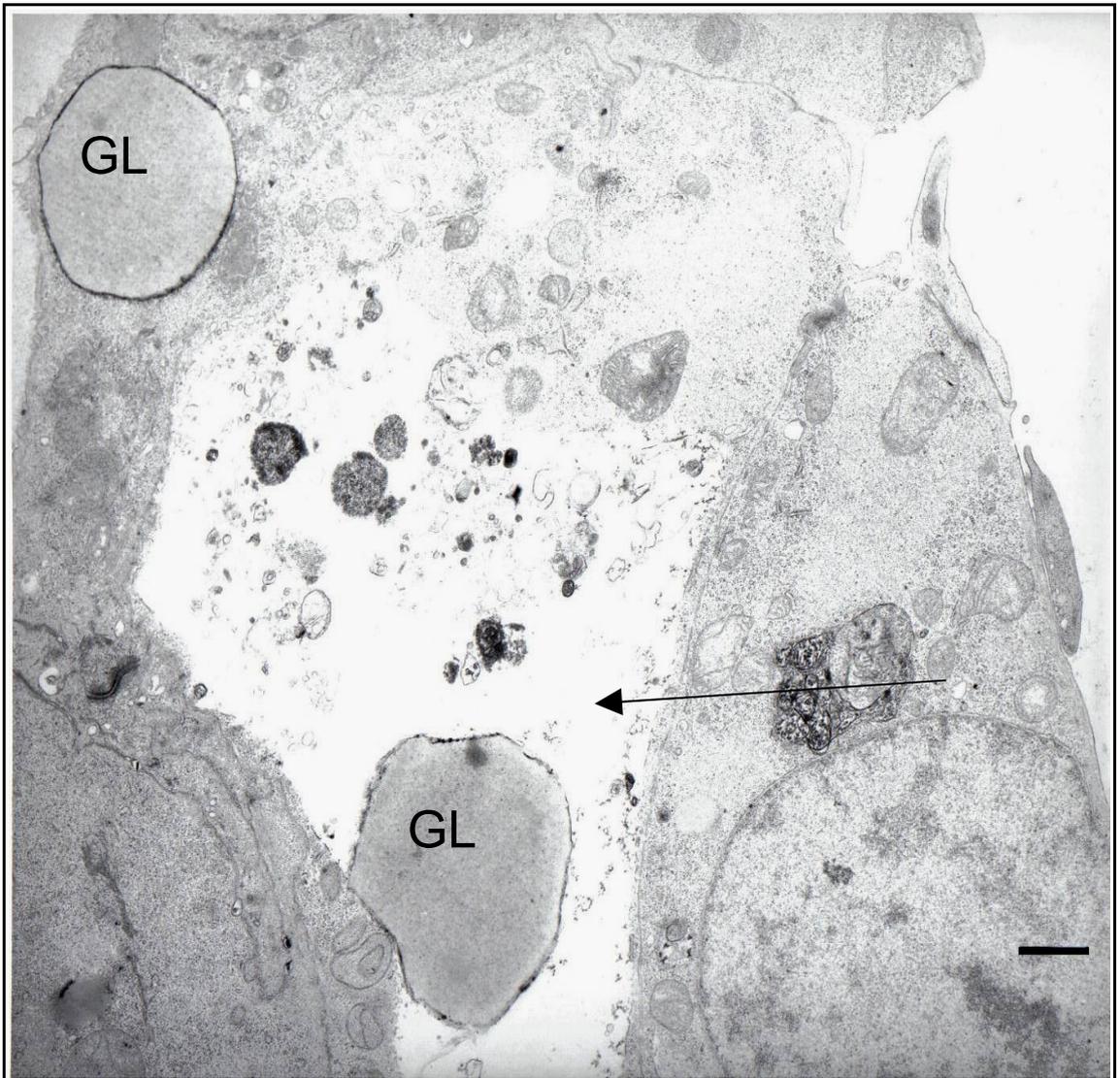


Figura 16. Microfotografía electrónica de un embrión de regular calidad (calidad 2). Se observan gotas lipídicas (GL) y detritus celulares (flecha). Barra: 1 μ m



Figura 17. Microfotografía electrónica de un fagosoma (flecha) dentro de las células del trofoblasto. Barra: 1 μ m.

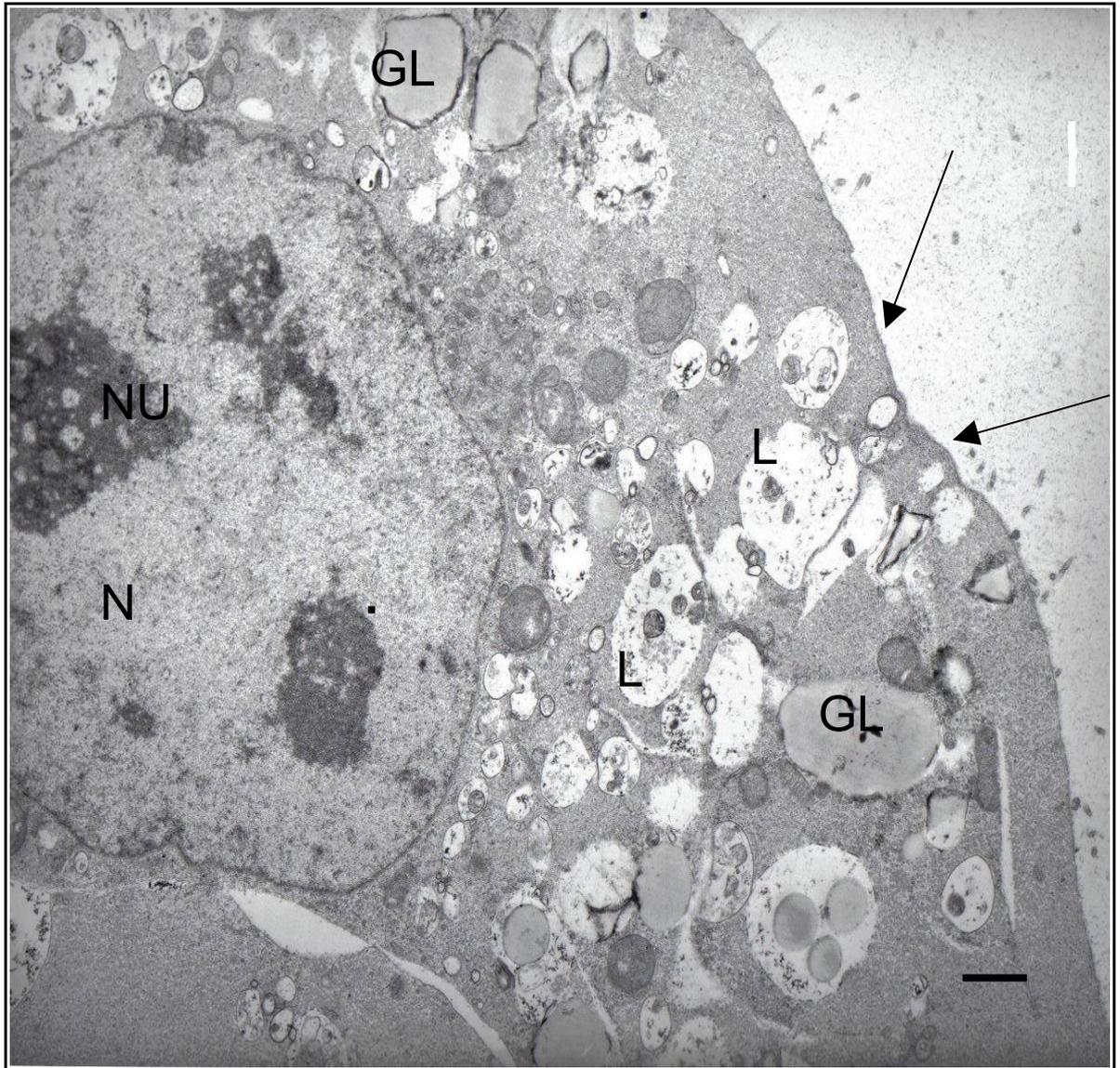


Figura 18. Microfotografía electrónica de un embrión de mala calidad (calidad 3). Célula del trofoblasto sin microvellosidades (flecha), con abundantes lisosomas secundarios (L), gotas lipídicas (GL); el núcleo (N) presenta tres nucleolos (NU) con un patrón fibrilar. Barra: 1 μm

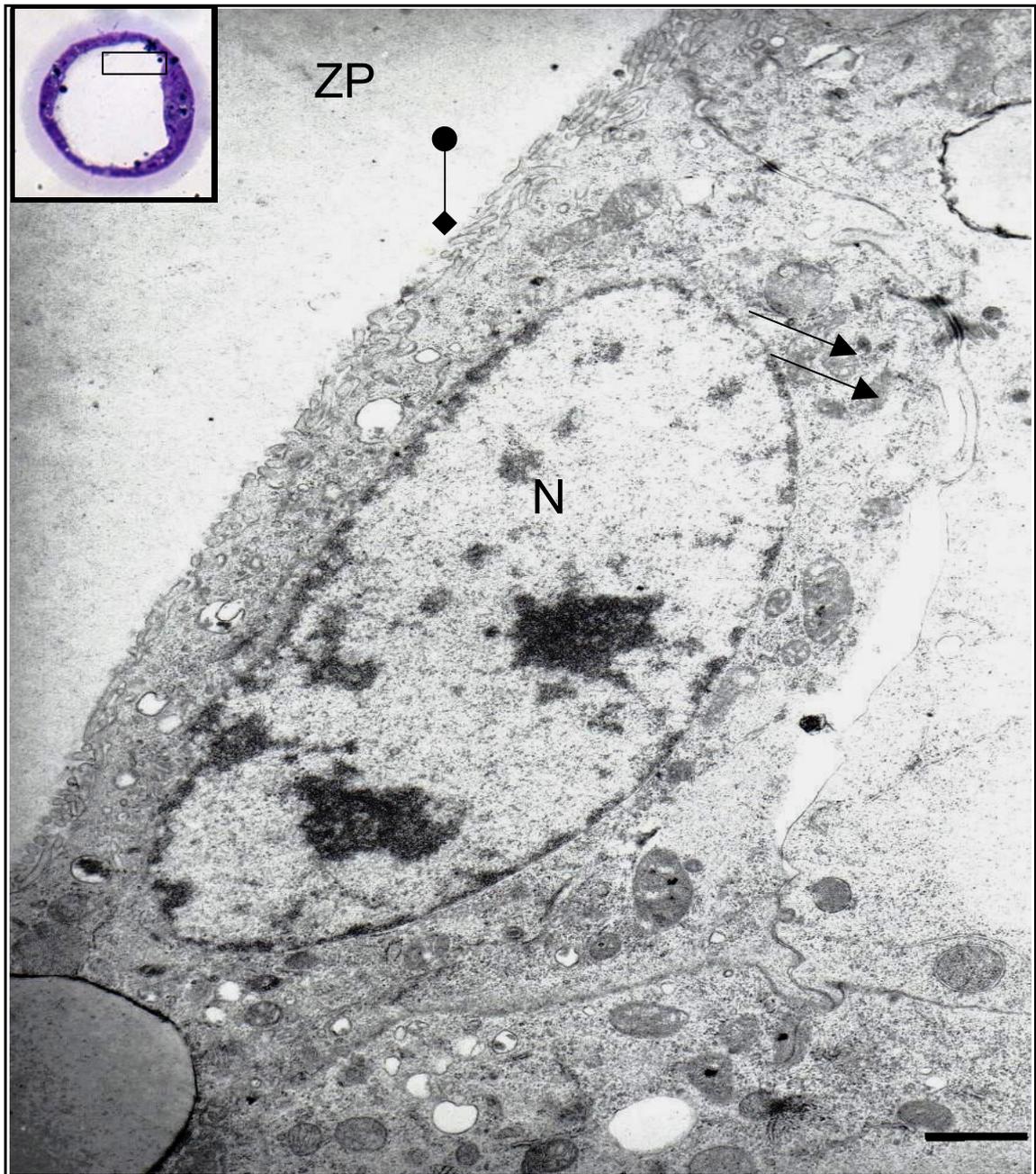


Figura 19. Microfotografía electrónica de un blastocisto clasificado como de buena calidad (calidad 1) por microscopía electrónica de transmisión. Las células del trofoblasto contienen abundantes microvellosidades (●◆) dirigidas hacia el espacio perivitelino, el núcleo (N) se observa de la misma forma de la célula y como tipo de unión sobresalen los desmosomas (flechas). Este corte concordó con la clasificación dada a este mismo embrión con el microscopio estereoscópico (calidad 1) En el recuadro de la parte superior izquierda se observa el corte semifino del mismo embrión. Barra: 1µm.

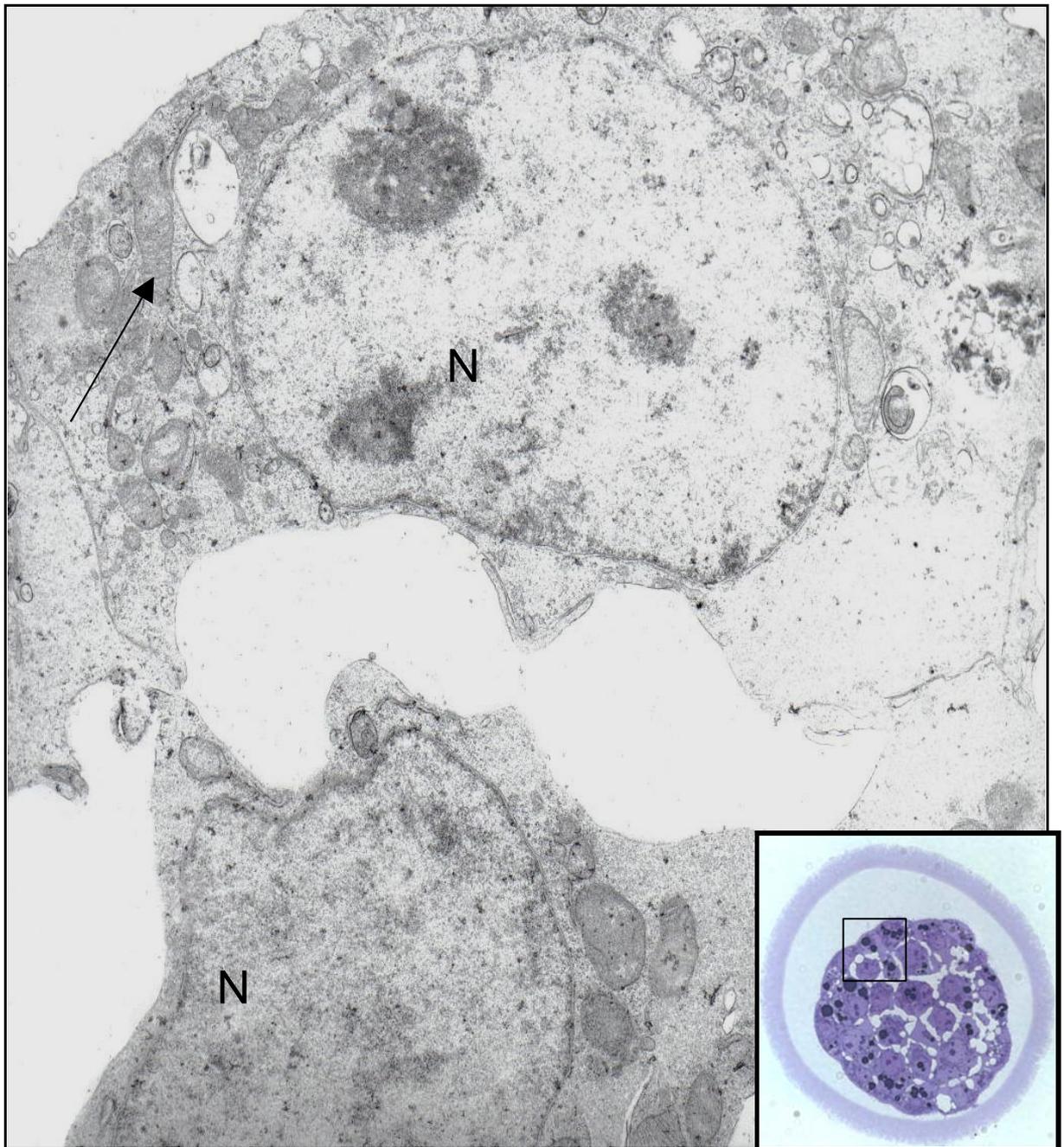


Figura 20. Microfotografía electrónica de una mórula clasificada como calidad 1. En la parte superior se aprecia una célula del trofoblasto con un núcleo (N) que corresponde a la misma forma de la célula y mitocondrias (flecha) con crestas abundantes. En la parte inferior se observa el núcleo de una célula de la masa celular interna. La clasificación dada a este mismo embrión con el microscopio estereoscópico (calidad 2) no concordó con la ultraestructural. En la parte inferior derecha se aprecia el corte semifino del mismo embrión. Barra: 1µm.

VIII. DISCUSION

En general los resultados obtenidos en la producción de embriones del presente trabajo concuerdan con diferentes autores quienes en el ganado Holstein han encontrado un promedio de 6 embriones por donadora (Elsden *et al* 1976, Hasler *et al* 1983, Walton y Stubbings 1986, Cordova y Fraga 1991, Dawuda *et al* 2002, Leroy *et al* 2005).

En relación al 46.4% de los embriones clasificados como calidad 1, los datos del presente trabajo son similares a los encontrados por Del Campo *et al* (1990) quienes trabajaron al igual que en este trabajo con novillas obteniendo un 45% de embriones transferibles. Sin embargo, Leroy *et al* (2005b) al medir la respuesta de embriones calidad 1 entre vacas y novillas obtuvieron 13% de embriones para vacas y 62% para novillas infiriendo que estas últimas producen embriones de mejor calidad que las vacas. Estos hallazgos han sido apoyados por diferentes autores (Lerner *et al* 1986, Hasler *et al* 1983, Walton y Stubbings 1986) quienes mencionan que al aumentar la edad de la donante disminuye el número de ovulaciones, la tasa de fertilidad y la calidad embrionaria. Por otra parte, en relación al número de embriones clasificados como buena calidad, Barrios *et al* (1982) obtuvieron 13 embriones de doce vacas demostrando que estas producen una menor cantidad de embriones comparado con los resultados del presente trabajo, en el cual se obtuvieron 32 embriones calidad 1 de diez novillas, de igual manera López *et al* (1995) observaron cierta superioridad en el promedio de embriones transferibles de novillas en comparación con las vacas. Todo lo anterior sugiere que en un trabajo de recolección embrionaria las donadoras de elección son las novillas (11-17 meses).

Respecto a la clasificación embrionaria por microscopía estereoscópica, los resultados del estadio de desarrollo concuerdan con Leroy *et al* (2005b) quienes trabajaron con novillas tal como en el presente trabajo encontrando un

23% de blastocistos. De igual manera Lindner y Wright (1983) concuerdan con los porcentajes obtenidos de blastocistos (23%) en este trabajo pero no así en mórulas donde el porcentaje del presente trabajo es menor (23%) comparado con el de Lindner y Wright (1983) de 37%. Por otra parte, de manera general diversos autores han informado que la mayoría de los embriones obtenidos son mórulas y blastocistos (Shea 1981, Cuello *et al* 2004, Palma 2001, Noriega *et al* 1995) concordando con ellos ya que estos estadíos fueron los encontrados en el presente trabajo.

La calidad de los embriones en fresco por microscopía estereoscópica del presente trabajo, concuerda con las características morfológicas citadas por diferentes autores quienes observaron en embriones de buena calidad que la forma debe ser esférica, con un color ámbar de tonalidad uniforme. Esta característica esta alterada en los embriones de mala calidad debido a la presencia de vesículas asociados a problemas metabólicos y a bajos porcentajes de sobrevivencia después de ser transferidos (Dorland *et al* 1990, Noriega *et al* 1995, Hill y Kuehner 1998, Leroy *et al* 2005, Van Soom *et al* 2003). Así mismo, la masa embrionaria es compacta, simétrica y uniforme en tamaño y la zona pelúcida se encuentra libre de irregularidades (Linares y King 1980, Lindner y Wright 1983, Kuzan 1988, Robertson y Nelson 1998). Los embriones correspondientes a calidad regular presentan moderadas irregularidades, como son la masa embrionaria no simétrica o blastómeros extruídos, los cuales se encuentran presentes en el espacio perivitelino siendo células que se quedaron en una etapa temprana de desarrollo y dependiendo de la cantidad, se correlacionan con el grado de degeneración embrionaria (Lindner y Wright 1983, Robertson y Nelson 1998). Los embriones correspondientes a una mala calidad, mostraban irregularidades en la forma de la masa celular observándose numerosos blastómeros extruídos, células de tamaño variado, algunos no compactados, pero aún con 25% del material celular intacto. Esta clasificación concuerda con Lindner y Wright (1983) y Robertson y Nelson (1998).

Respecto a las evaluaciones por microscopía de luz, las características morfológicas de los embriones concuerdan con otros trabajos (Linares y Plöen 1981, Massip *et al* 1981, Plante y King 1994, Abe *et al* 1999, Abe *et al* 2002) ya que los dos tipos de células se diferencian claramente, los blastómeros se aprecian bien delimitados cuyos núcleos están colocados centralmente. Sin embargo, respecto a las clasificaciones, mientras que el porcentaje de los embriones calidad 1 se mantuvo (33%), el de los clasificados como calidad 2 disminuyó de 33 a 30% y el de los malos aumento de 33 a 37%, estos resultados difieren de los de Aguilar *et al* (2002) quienes realizaron un estudio similar en *Bos indicus* encontrando que el porcentaje de embriones calidad 1 disminuyó de 51 a 26%, mientras los regulares y malos aumentaron 24 a 32% y 24 a 42%, respectivamente. Basándose en los resultados del presente estudio y en los resultados presentados por Aguilar *et al* (2002) se puede inferir que la clasificación de embriones calidad 1 para *Bos indicus* es inexacta (25%) mientras que para el ganado *Bos taurus* la clasificación de embriones de buena calidad es acertada. No así para los regulares, de los cuales el 40% en realidad eran de mala calidad al ser evaluados por microscopía de luz. Este error de clasificación de los embriones regulares lo han observado diferentes autores como Farin *et al* (1995), Van Soom *et al* (1996), De Leeuw (1996) y Lopes *et al* (2005) quienes determinaron que la concordancia que existe entre evaluadores para asignar la calidad es pobre, presentándose estos problemas al asignar la calidad 2. Esta falla podría ser debida a la apariencia morfológica que presentan los embriones la cual no es tan perfecta a la evaluación visual. Solamente al evaluarlos a nivel ultraestructural es donde se aprecia la calidad de células y por lo tanto su viabilidad.

Para confirmar la clasificación hecha por microscopía estereoscópica y microscopía de luz, los embriones fueron evaluados con mayor detalle mediante el microscopio electrónico de transmisión, observándose que por microscopía electrónica el porcentaje de embriones buenos aumento de 33 a 47%, mientras que los regulares disminuyeron de 33 a 20% apreciándose que

el número de embriones clasificados como de pobre calidad se mantenían en un 33%. Estos resultados no concuerdan con Aguilar *et al* (2002) quienes observaron en el ganado *B. indicus*, los embriones calidad 1 de 51% por microscopía estereoscópica disminuyeron a un 24%, incrementando los regulares y malos de 24 a 29% y 24 a 46% respectivamente. Estos hallazgos confirman lo encontrado por microscopía de luz donde los criterios de clasificación para *Bos taurus* son eficientes mientras que para el ganado *Bos indicus* los criterios de clasificación no son tan exactos por lo que se sugiere el establecimiento de criterios de selección para embriones *Bos indicus* acorde a las características de estos embriones pues el presente estudio confirma que la coincidencia entre los criterios de calidad es diferente entre las dos especies.

Una posible explicación de la discrepancia entre los embriones de tipo *Bos indicus* en comparación con los *Bos taurus* esta en las diferencias ultraestructurales que presentan como es la cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma, la cual es mayor en embriones *Bos indicus* que *Bos taurus* (datos aun no publicados) asociándose esta característica con embriones de mala calidad. Abe *et al* (2002b, 1999a) al cultivar embriones *in vitro* con suero y sin suero encontraron que los embriones cultivados con suero contenían una mayor cantidad de gotas lipídicas que los cultivados sin suero, observando que los embriones cultivados sin suero, después de la criopreservación, obtenían mejores resultados de sobrevivencia que los cultivados con suero, infiriendo que el exceso de acumulación de gotas lipídicas afecta la criotolerancia. Para demostrar esto, Ushijima *et al* (1999) centrifugaron embriones con la finalidad de remover las gotas lipídicas sometiénolos después a la criopreservación observando mejores porcentajes de sobrevivencia en embriones sin gotas lipídicas que con gotas lipídicas. Estos hallazgos muestran como un exceso de gotas lipídicas afecta la criopreservación.

En relación a lo anterior, Pegoraro *et al* (2004) al realizar la evaluación a nivel ultraestructural de embriones Jersey vs Holstein encontraron en los primeros un exceso de gotas lipídicas, las cuales no permiten un congelamiento

adecuado, como también lo mostró Pegoraro *et al* (2003) quienes observaron que los embriones Jersey al ser congelados pierden la integridad de la membrana apreciándose formación de cristales de hielo los cuales dañan irreversiblemente a las células. Estos hallazgos sugieren que la baja sobrevivencia de los embriones con un alto contenido lipídico se debe a que la congelación convencional no permite la deshidratación correcta de la célula, por lo que al congelarse se produce la formación de cristales de hielo causando un daño irreversible y por lo tanto pérdida de viabilidad con la consecuente baja en los porcentajes de preñez.

Si estos hallazgos los traspolamos a embriones *Bos indicus* podremos entender que al existir diferencias ultraestructurales, entre embriones de las dos especies, los criterios de clasificación deben de cambiar para el ganado *Bos indicus* ya que los que existen fueron establecidos principalmente para el *Bos taurus*. Una posible explicación de esta disparidad es la alta cantidad de gotas lipídicas encontradas en los embriones de tipo *Bos indicus*, pero este juicio merece mayor investigación. Otra posibilidad es la evidencia publicada por Ferguson y Leese (2006) quienes demuestran que los triglicéridos son una fuente de energía para la maduración de los ovocitos, desarrollo embrionario y pre-implantación por lo que podría sugerirse que los embriones *Bos indicus* necesitan de mayor energía para la pre-implantación que los *Bos taurus*.

Las diferencias de calidad embrionaria entre especies sugieren que la calidad del embrión depende de la calidad del ovocito y este a su vez depende del diámetro folicular. La calidad del ovocito ha sido definida como la capacidad de desarrollo hasta blastocisto (Merton *et al* 2003) y se ha observado que los ovocitos colectados de folículos dominantes (>13mm) producen un mayor número de blastocistos comparado con los que miden de 3 a 8mm (Machatkova *et al* 2004, Hagemann *et al* 1999, Tan y Lu 1990, Lonergan *et al* 1994) sugestivo de que la calidad del ovocito aumenta conforme se incrementa el diámetro folicular. Por otra parte Greve *et al* (1995) mencionan que una

respuesta superovulatoria alta incrementa la producción de embriones de mala calidad, esto debido a que mientras mayor número de folículos se encuentran el diámetro folicular de estos es menor. En base a esto Baruselli *et al* (2006) señalan que el *Bos indicus* recluta un mayor número de folículos en una onda folicular que el *Bos taurus* (33 vs 25% respectivamente) debido a las diferencias que existen en la dinámica folicular (Niasari-Naslaji *et al* 1999) la cual es caracterizada por dos o tres ondas foliculares aunque a veces cuatro en el cebú (Bó *et al* 2003). Estos datos sugieren que al poseer un mayor número de folículos, la sub especie *Bos indicus*, el diámetro de estos será menor produciéndose así ovocitos de baja calidad y por lo tanto embriones de mala calidad.

La técnica de microscopía electrónica de transmisión permite una mayor precisión para establecer criterios de calidad en los embriones bovinos, gracias a su mayor poder de resolución. Sin embargo, es inválida para su utilidad práctica en el campo. Se ha propuesto que el microscopio de contraste de fases invertido ofrece mejor apreciación morfológica que el estereoscópico pudiendo colocar a los embriones en su correcta clasificación (Linares y Plöen 1981, Dorland 1990, Linares y King 1980). Resultaría de gran importancia realizar un estudio comparativo entre las microscopias de fase y estereoscópica.

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran como los criterios de clasificación propuestos por Robertson y Nelson (1998) en el Manual de La Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria para *Bos taurus* son eficientes.

IX. LITERATURA CITADA

1. **Abe H**, Aoyagi K., Aoyagi S., *et al.* Respiratory activity and ultrastructural features of bovine somatic nuclear transfer embryos. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19; 1: 129-130. Abstract 22.
2. **Abe H.**, Matsuzaki S and Hoshi H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology* 2002, 57: 1273-1283.
3. **Abe H.**, Otoi T., Tachikawa S., *et al.* Fine structure of bovine morulae and blastocyst in vivo and in vitro. *Anat Embryol* 1999, 199:519-527
4. **Abe H.**, Yamashita S., Itoh T., Satoh T and Hoshi H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum- supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 1999(a), 53: 325- 335.
5. **Abe H.**, Yamashita S., Satoh T and Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum- containing media. *Mol Reprod Dev* 2002(a), 61: 57-66.
6. **Aguilar MM.**, Galina CS., Merchant H., *et al.* Comparison of stereoscopy, Light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod Dom Anim.* 2002, 37: 341-346.
7. **Arlotto T.**, Schwartz J-L., First NL., and Leibfried-Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1996, 45: 943-956.
8. **Asada M.**, Hashiyada Y., and Konishi K. Effect of paternal of donor on superovulatory response and embryo quality in Japanese Black Heifers. *Repro Fertil Dev* 2004, 16; 1: 287. Abstract 335.
9. **Baguisi A.**, Roche JF, and Boland MP. Assisted hatching of cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology.* 1998, 49: 161.
10. **Balaban B and Urman B.** Embryo culture as diagnostic tool. *Reproductive BioMedicine Online* 2003 Diciembre, 7; 6: 671-682. Disponible en: URL:<http://www.ingentaconnect.com>
11. **Barrios DR.**, Ramge JC, Harms PG., Blake RW and Kraemer DC. Evaluation of embryo collection and transfer as diagnostic tools for bovine infertility. *Theriogenology.* 1982, 17; 1: 77.
12. **Baruselli PS.**, Mantel F de Sá F., Martins CM., *et al.* Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology.* 2006; 65: 77-88.
13. **Bastidas P and Randel RD.** Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology.* 1987, 28; 4: 531- 540.
14. **Betteridge KJ and Féchon JE.** The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology.* 1988, 21; 1: 155-187.
15. **Betteridge KJ.** An historical look at embryo transfer. *J Reprod Fert* 1981, 62: 1-13.

16. **Bilodeau-Goeseels S., and Panich P.** Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Theriogenology*. 2002, 71: 143-155
17. **Bó GA.,** Baruselli PS and Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Repro Sci* 2003, 78: 307-326.
18. **Boni R.,** Tosti E., Roviello S and Dale B. Intercellular communication in In vivo-and in vitro- produced bovine embryos. *Biol Reprod* 1999, 61: 1050-1055.
19. **Butler JE and Biggers JD.** Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*. 1989, 31; 1: 115-126.
20. **Callesen H.,** Løvendahl P., Bak A and Greve T. Factors affecting the development stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sci* 1995, 73: 1539-1543
21. **Carnegie JA.,** Morgan JJ and McDiarmid NL. Evaluation of ALAMAR-BLUE™ as a potential embryo viability assay. *Theriogenology*. 1998, 49; 1: 228
22. **Chartrain I and Picard L.** Ultrastructural analysis of bovine embryos at days 6 to 8: correlation with embryo quality. *Theriogenology*. 1988, 29; 1: 236.
23. **Christensen LG.** Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*. 1991, 35; 1: 141-149.
24. **Contreras DA.,** Galina CS., Ávila JG., *et al.* A system to evaluate the quality of frozen embryos through short term culture. Enviado para su publicación en *J Anim Sci* 2007
25. **Cordova SLA and Fraga EE.** Utilización de anticuerpos monoclonales contra la PMSG durante la superovulación de vacas cebú y tipo europeo. *Vet Mex* 1991, 22;1: 47- 51.
26. **Crosier A.,** Farin PW., Dykstra MJ., *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 2000, 62: 1459-1465.
27. **Crosier A.,** Farin PW., Dykstra MJ., *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine blastocyst produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 2001, 64; 5: 1375- 1385.
28. **Cuello C.,** Berthelot F., Martinat-Botté F., *et al.* Transfer of vitrified blastocyst from one or two superovulated large white hyperprolific donors to meishan recipients: Reproductive parameters at day 30 of pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 2004, 16; 1: 208. Abstract 173.
29. **Cutini A.,** Teruel M and Cabodevila J. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Taurus*. 2000, 7:28-39.
30. **Da Silva MF and Metelo R.** Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. *Reprod Dom Anim* 2005, 40: 205-209.

31. **Daniel JC and Krishnan.** Amino acid requirements for growth of the rabbit blastocyst in vitro. *Cell Physiol* 1967, 70; 2: 155-160.
32. **Dawuda PM.**, Scaramuzzi RJ., Leese HJ., *et al.* Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 2002, 58: 1443-1455.
33. **De Leeuw AM.** Evaluation of uniformity among persons in embryo grading from video recordings. *Theriogenology*. 1996, 45: 230.
34. **Del Campo MR.**, Becerra F., González M., *et al.* Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. *Theriogenology*. 1990, 33; 1: 208.
35. **Dobrinsky JR.** Advancements in criopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 2002,57:285-302.
36. **Donaldson LE.** Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology*. 1984, 21; 6: 1013-1018.
37. **Dorland M.**, Boer-Brouwer H and Otter T. Vesicles as a marker for bovine embryo quality. *Theriogenology*. 1990, 33; 1: 216.
38. **Driancourt MA.**, Reynaud K and Smitz J. Differences in follicular function of 3 month old calves and mature cows. *Reproduction* 2001, 121: 463-474.
39. **Duby RT.**, Hill JL., O'Callaghan D., *et al.* Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*. 1997, 47: 332 (Abstract).
40. **Elsden RP**, Hasler JF and Seidel GE. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*. 1976. 6; 5: 523-529.
41. **Eyestone WH and First NL.** Bovine oocyte maturation and embryo development. In: *Early embryo development and paracrine relationships*. By Alan R. 1990:1-10.
42. **Fair T.**, Lonergan P., Dinneyes A., Cottell DC., Hyttel P and Ward FA. Ultrastructure of bovine blastocisto following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev* 2001, 58: 186-195.
43. **Farin PW**, Britt JH., Shaw DW and Slenning BD. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*. 1995, 44:339-349.
44. **Fléchon JE and Gwatjin RBL.** Immunocytochemical studies on the zona pellucida of cow blastocyst. *Gamete Res* 1980, 3: 141-148.
45. **Flood PF.**, Betteridge KJ and Diocee MS. Transmission electron microscopy of horse embryos 3-16 days after ovulation. *J Reprod Fert Suppl*. 1982, 32: 319-327.
46. **Gandolfi F.**, Vassena R and Lauria A. The development competence of the oocyte before puberty: issomething missing?. *Reprod Dom Anim* 2000; 35: 66-71.
47. **Gardner DK.** Changes in requirements and utilization of nutrients during embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*. 1998, 49: 83-102.

48. **Gjørret JO.**, Knijn HM., Dieleman SJ., *et al.* Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 2003, 69:1193-1200.
49. **Godkin AM.**, Leslie KE., Wain GM and Leslie BE. Factors affecting pregnancy rate following non-surgical transfer of frozen bovine embryos. *Theriogenology*. 1987, 27; 1: 230.
50. **Greve T and Callesen H.** Embryo technology: implications for fertility in cattle. *Rev Sci Tech off Int Epiz* 2005, 24; 1: 405-412.
51. **Greve T**, Callesen H, Hyttel P. *et al.* The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*.1995, 43: 41-50.
52. **Guillomot M and Guay P.** Ultrastructural features of the cell surfaces of uterine and trophoblastic epithelia during embryo attachment in the cow. *Anat Rec* 1982, 204: 315-322.
53. **Hagemann LJ.**, Beamont SE., Berg M., *et al.* Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev* 1999, 53: 451-458.
54. **Halley SM.**, Rhodes RC., McKellar LD., *et al.* Successful superovulation, nonsurgical collection and transfer of embryos from Brahman cows. *Theriogenology*. 1979, 12; 2: 97-108.
55. **Hardy K.** Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod* 1997, 3; 10: 919-925.
56. **Hardy K.**, Handyside AH y Winston RML. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development*. 1989, 107: 597-604.
57. **Hasler JF.** Symposium: reproductive technology and genetic improvement. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 1992, 75: 2857-2879.
58. **Hasler JF.** The Holstein cow in embryo transfer to day as compared to 20 years ago. *Theriogenology*. 2006, 65: 4-16.
59. **Hasler JF**, McCauley AD., Lathrop WF and Foote RH. Effect of donor-embryo recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*. 1987, 27:139-168.
60. **Hasler JF**, McCauley AD., Schermerhorn EC and Foote RH. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*. 1983, 19; 1: 83-99.
61. **Hay-Schmidt A.**, Viuff D., Vajta G., Callesen H y Hyttel P. Development of cell adhesion and junctional complex proteins in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. 1998, 49; 1: 180.
62. **Hernández-Cerón J.**, Chase CC and Hansen PJ. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus Breeds. *J Dairy Sci* 2004, 87: 53-58.
63. **Hill BR and Kuehner LF.** Bovine donor blood cholesterol, embryo colour and embryo freezability. *Theriogenology*. 1998, 49; 1: 168.

64. **Holm P.**, Greve T and Willeberg P. Description and analysis of factors influencing the response of 449 superovulated donor cows and heifers. *Theriogenology*. 1987, 27; 1: 238.
65. **Hugentobler SA.**, Diskin MG., Leese HJ., et al. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev* 2007, 74; 4: 445-454.
66. **Isachenko V.**, Isachenko E., Michelmann W., et al. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and Porcine GV-oocytes. *Anat Histol Embryol*. 2001, 30; 6:333-338.
67. **Itoi F.**, Himaki., Kubota C., et al. Differences exist in zona pellucida hardness between in vivo –and in vitro- generated bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19; 1: 207.
68. **Jun JH**, Lee HJ, Song SJ., et al. Zona pellucida supports compaction of mouse embryos; effect of zona pellucida removal on in vitro development of pre-compaction and post-compaction stage mouse embryos. *Theriogenology*. 1998, 49; 1: 204
69. **Kaňka J.**, Smith SD., Soloy E., Holm P and Callesen H. Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev* 1999, 52: 253-263.
70. **Kanuya N.**, Callesen H., Hyttel P., et al. Superovulatory response of dairy cattle (Bos taurus) in a tropical environment. *Theriogenology*. 1997, 47: 1583-1593.
71. **Karnovsky MJ**. A formaldehyde-Glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965, 27: 137A. Abstract 270.
72. **Keefe D.**, Tran P., Pellegrin C., and Oldenbourg R. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod* 1997, 12; 6: 1250-1252.
73. **Koyama H.**, Suzuki H., Yang X. et al. Analysis of polarity of bovine and rabbit embryos by scanning electron microscopy. 1994. *Biol Reprod* 50:163-170.
74. **Krinninger III CE.**, Block J., Al-Katanani YM., et al. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim Reprod Sci* 2003, 78: 13-24.
75. **Kubisch HM.**, Larson MA and Roberts RM. Relationship between age of blastocyst formation and interferon- τ secretion by In vitro- derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1998, 49: 254-260.
76. **Kuzan FB**. Classification of embryos prior to freezing. In: Elsdon RP and GE Seidel. Procedures for recovery, bisection, freezing and transfer eeg bovine embryos. Animal reproduction and biotechnology laboratory Bulletin. 1988, No 2: 34-45.
77. **Larson MA.**, Ealy AD., Murphy CN., Roberts RM and Kubisch HM. Interferon- τ secretion by bovine blastocysts following in vitro or in vivo fertilization and culture. *Theriogenology*. 1999, 51; 1: 241

78. **Ledezma JJH.**, Mathialagan N., Villanueva C., *et al.* Expression of bovine trophoblast interferons by in Vitro-derived blastocyst is correlated with their morphological quality and stage of development. *Mol Reprod Deve* 1993, 36: 1-6.
79. **Lerner S.**, Thayne W., Baker R., Hensche *et al.* Age, dose FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. 1986. *J Anim Sci* 63: 176-183.
80. **Leroy JLMR.**, Goossens L., Geldhof A., *et al.* Embryo quality and colour in Holstein Friesian and Belgian Blue cattle in relation to donor blood cholesterol and tryglicerides. *Repro Fert Develop* 2004, 16; 1: 211. Abstract 178.
81. **Leroy JLMR.**, Goossens L., Geldhof A., *et al.* Embryo quality and color in Holstein Friesian heifers and cows in relation to serum parameters. *Reprod Fertil Dev* 2005, 17; 2: 232 Abstract 162.
82. **Leroy JLMR.**, Genicot G., Donnay I and Van Soom A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reprod Dom Anim* 2005(a), 48: 76- 78.
83. **Leroy JLMR.**, Opsomer G., De Vlieghe S., *et al.* Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*. 2005(b), 64: 2022-2036.
84. **Linares T and King WA.** Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Theriogenology*. 1980, 14:123-133
85. **Linares T and Plöen L.** On the ultrastructure of seven day old normal (blastocyst) and abnormal bovine embryos. *Anat Histol Embryol* 1981, 10: 212-226.
86. **Lindner GM and Wright RW.** Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 1983, 29: 407-416.
87. **Lohuis MM.** Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*. 1995, 43: 51-60.
88. **Lonergan P.**, Monaghan P., Rizos D., *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1994, 37:48-53.
89. **Lonergan P.**, Piumi F and Humblot P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the development of bovine embryos in vitro and in vivo. *Theriogenology*. 1999, 51; 1: 326.
90. **Lopes AS.**, Ramsing N., Larsen LH., *et al.* Correlation between oxygen respiration rates and morphology, sex, diameter and developmental stage of single bovine IVP-embryos. *Reprod Fertil Dev* 2005, 17: 151. Abstrac 2
91. **López JRA.**, Gamboa MEA y Holy L. Respuesta superovulatoria en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones tropicales y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Vet Mex* 1995, 26; 3: 189-193.
92. **Machatkova M.**, Krausova K., Jokesova E., and Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and phase

- of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*.2004 61: 329-335.
93. **Maddox-Hyttel P.**, Alexopoulos NI., Vajta G., *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction*. 2003, 125: 607-623.
 94. **Márquez YC.**, Galina CS., Moreno N., Ruiz H and Merchant H. Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 2005, 40: 553-558.
 95. **Márquez-Alvarado YC.**, Galina CS., Castilla B.,*et al.* Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the tunel technique. *Reprod Dom Anim*. 2004, 39: 141-145.
 96. **Massip A.**, Mulnard J., Huygens R., *et al.* Ultrastructure of the cow blastocyst. *J Submicrosc Cytol* 1981, 13; 1: 31-40
 97. **Matwee C.**, Betts DH and King WA. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*. 2000, 8: 57-68.
 98. **Mermillod P.**, Le Bourthis D., Lonergan P., *et al.* Assessment of cytoplasmic competence of prepuberal calf oocytes by use nuclear transfer. *Theriogenology*. 1998, 49:187.
 99. **Mertens E.**, Besenfelder U., Gilles M., *et al.* Influence of in vitro culture of bovine embryos on the structure of the zona pellucida. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19; 1: 211-212
 100. **Merton JS.**, De Ross APW., Mullaart E., *et al.* Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 2003, 59: 651-671.
 101. **Mohr LR and Trounson AO.** Comparative ultrastructure of hatched human, Mouse and bovine blastocyst. *J Reprod Fert*. 1982, 66: 499-504.
 102. **Mohr LR and Trounson AO.** Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod* 1981, 25: 1009-1025.
 103. **Montiel F.**, Galina CS., Rubio I and Corro M. Factors affecting pregnancy rate of embryo transfer in *Bos indicus* and *Bos taurus/Bos indicus* cows. *J Appl Anim Res* 2006, 29: 149-152.
 104. **Moriyasu S.**, Hirayama H., Sawai K., *et al.* Relationship between respiratory activity and the pregnancy rate of bisected bovine embryos in vivo. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19; 1: 219. Abstract 204.
 105. **Nakagawa A.**, Suzuki T., Suga T., *et al.* Morphology and size of embryos recovered from superovulated cows. *J Vet Med Sci* 1991, 53; 2: 287-290.
 106. **Neto CA,** Sanches BV., Perri SHV, Seneda MM and Garcia JF. Improvement in embryo recovery using uterine double flushing. *Reprod Fertil Dev* 2004, 16; 1: 207. Abstract 171.
 107. **Niasari-Naslaji A.**, Sarhaddi F., Naji A., *et al.* Ovarian follicular dynamics in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 1999, 51; 1: 307.

108. **Niemann H.** Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*. 1991, 35; 1: 109-123.
109. **Nogueira MFG.**, Barros BJP., Teixeira AB., *et al.* Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*. 2002, 57: 1625-1634.
110. **Noriega R.**, Martínez S y Flores R. Técnica de búsqueda, manipulación y evaluación embrionaria. En: *Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos*. 1995: 32-45. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
111. **Overström EW.** In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology*. 1996. 45: 3-16.
112. **Palma GA.** Evaluación morfológica de los embriones bovinos. En: *Biotecnología de la reproducción*. 2001:125-132.
113. **Palma GA.**, Tortonese DJ and Sinowatz F. Development capacity in vitro of prepubertal oocytes. *Anat Histol Embryol* 2001(a), 30; 5: 295.
114. **Paz P.**, Sánchez AJ., De La Fuente J., *et al.* Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. *Theriogenology*, 2001; 55:1107-1116.
115. **Pegoraro L.**, Barros S., Sinowatz F., *et al.* Lipidic content in jersey blastocyst compared with Holstein and IVP embryos. *Reprod Fertil Dev* 2004, 16; 1: abstract 296
116. **Pegoraro LMC.**, Barros, S, Saalfeld, M.H., Castro LAS., Rocha, N.E.M., Abrantes, V., Lorenzini, O., Domingues, F., Silva, A., Aghnonni, L., Viana, L. Estudo comparativo da ultra-estrutura de embriões Jersey submetidos a diferentes métodos de criopreservação. *Acta Scientiae Veterinariae* 31 (suplemento), p.522, 2003.
117. **Pinyopummintr T and Bavister BD.** Energy substrate requirements for in vitro development of early cleavage-stage bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1996, 44: 193-199.
118. **Plante L and King WA.** Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *J Assist Reprod Gen* 1994, 11; 10: 515-529.
119. **Pomar FJ.**, Teerds KJ., Kidson A., *et al.* Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocyst of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*. 2005, 63; 8: 2254-2268.
120. **Pryor JH.**, Looney CR., Walker D., *et al.* Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of in vivo embryos from Brahman cattle. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19; 1: 224-225.
121. **Putney DJ.**, Thatcher WW., Drost M., Wright JM and De Lorenzo MA. Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the southwest region of the United States. *Theriogenology*. 1988, 30: 905-922.
122. **Randel RD.** Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Theriogenology*. 1984, 21; 1: 170-185.

123. **Revel F.**, Mermillod P., Peynot N., *et al.* Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil* 1995, 103: 115-120.
124. **Rivera RM.**, Kelley KL., Erdos GW and Hansen PJ. Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiological relevant heat shock. *Biol Reprod* 2003, 69: 2068-2077.
125. **Rizos D.**, Fair T., Papadopoulos S., *et al.* Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 2002, 62: 320-327.
126. **Robertson I and Nelson RE.** Certification and identification of the embryo. 3rd ed., Illinois, USA. In: *Manual of the international embryo transfer society*. 1998:103-116.
127. **Roelofs JB.**, *et al.* Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology*. 2006, 66; 9: 2173-2181.
128. **Rondeau M.**, Guay P., Goff AK and Cooke GM. Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. *Theriogenology*. 1995, 44: 351-366.
129. **Rutledge JJ.**, Monson RL., Northey DL and Leibfried-Rutledge ML. Seasonality of cattle embryo production in a temperate region. *Theriogenology*. 1999, 51; 1: 330.
130. **Rutledge ML.**, Northey DL., Monson R and Rutledge JJ. Hatching ability of in vitro produced cattle embryos is related to time of blastocoele appearance in culture. *Theriogenology*. 1999a, 51; 1: 325.
131. **Ryan DP.**, Prichard JF., Kopel E and Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology*. 1993, 39: 719- 737.
132. **Saalfeld MH.**, Pegoraro LMC., Lorenzini O., Domingues F., Aghnonni L. Sobrevivência in vitro de embriões Jersey submetidos a vitrificação ou congelamento convencional. *Acta Scientiae Veterinariae* 31 (suplemento), p. 552, 2003.
133. **Sakagami N.**, Akiyama K and Nakazawa Y. The relationship between oxygen consumption rate and pregnancy rate of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19; 1: 225. Abstract 216.
134. **Sartori R.**, Sartor-Bergfelt R., Mertens AS., *et al.* Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002, 85: 2803-2812.
135. **Seidel GE.** Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*. 1981, 211; 23: 351-357.
136. **Shamsuddin M and Martinez HR.** Fine structure of bovine blastocyst developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *J Vet Med A* 1994, 41: 307-316.
137. **Shea BF.** Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*. 1981, 15; 1: 31-35.

138. **Shea BF.**, Janzen RE and McDermand DP. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. *Theriogenology*. 1984, 21; 1: 186- 195.
139. **Sinowitz F.**, Töpfer-Petersen E., Kölle S and Palma G. Functional morphology of the Zona Pellucida. *Anat Histol Embryol* 2001, 30: 257-263.
140. **Sirard MA.**, Richard F., Blondin P and Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. 2006. *Theriogenology*. 65: 126-136
141. **Spell AR.**, Beal WE., Corah LR and Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 2001, 56: 287- 297.
142. **Tan SJ and Lu KH.** Effects of different oestrus stages of varies and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology*. 1990, 33: 335.
143. **Tervit HR**, Cooper MW, Goold PG and Haszard GM. Nonsurgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology*. 1980,13:63-71.
144. **Ushijima H.**, Yamakawa H and Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos alter delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod* 1999, 60: 534-539.
145. **Van Soom A.**, Mateusen B., Leroy J and De Kruif A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reproductive BioMedicine Online*. 2003 Diciembre, 7; 6: 664-670. Disponible en URL: <http://www.ingentaconnect.com>
146. **Van Soom A.**, Ysebaert MT., Vanhoucke-De Medts A., *et al.* Sucrose-induced shrinkage of in vitro produced bovine morulae: Effect on viability, morphology and ease of evaluation. *Theriogenology*. 1996, 46; 7: 1131-1147.
147. **Van Soom.**, Boerjan ML., Bols PEJ., *et al.* Timing of compactation and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo alter superovulation. *Biol Reprod* 1997, 57: 1041-1049.
148. **Vanronse G.**, Nauwynck H., Van Soom A., *et al.* Why is the zona pellucida of in vitro produced bovine embryos an efficient barrier for viral infection? A scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Theriogenology*. 1999, 51; 1: 276.
149. **Visintin JA.**, Martins JFP., Bevilacqua EM., *et al.* Cryopreservation of *Bos taurus* VS *Bos indicus* embryos: are they really different?. *Theriogenology*. 2002, 57: 345-359.
150. **Viuff D.**, Rickords L., Offenberd H., *et al.* A high proportion of bovine blastocyst produced in vitro are mixoploid. *Biol Reproduction*. 1999, 60: 1273-1278.
151. **Walton JS and Stubbings RB.** Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein Friesian cows. *Theriogenology*. 1986, 26; 2: 167-177.

152. **Walker SK.**, Hill JL., Kleemann DO and Nancarrow CD. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod* 1996, 55: 703-708.
153. **Wang Q and Sun Q-Y.** Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19; 1: 1-12.
154. **Wassarman PM.** The parks lecture. Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization. *J Reprod Fert* 1999, 116: 211-216.
155. **Watson AJ.**, Westhusin ME., De Sousa PA., Betts DH and Barcroft LC. Gene expression regulation blastocyst formation. *Theriogenology*.1999, 51: 117-133.
156. **Wilson JM.**, Caceci T., Potter GD and Kraemer DC. Ultrastructure of cryopreserved horse embryos. *J Reprod Fert Suppl* 1987, 35: 405-417.
157. **Wright JM.** Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*.1981, 15; 1: 43-56.
158. **Wyllie AH.**, Kerr JF y Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980, 68: 251-306.
159. **Yang MY and Rajarnabendran R.** Involvement of apoptosis in bovine blastocyst produced in vitro. *Theriogenology*. 1999, 51; 1: 336.
160. **Zanenga CA.** Freezing on zebu embryos-development and viability. In: X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 1993: 125-130. Belo Horizonte, MG, Brazil.
161. **Zeron Y.**, Ocheretny A., Kedar O., Borochoy A., Sklan D and Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to development competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. 2001, 121: 447-454.