



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL

**ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE DOS SISTEMAS DE EVALUACION  
(MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO vs INVERTIDO DE CONTRASTE  
DE FASES) EN EMBRIONES DE GANADO *BOS INDICUS***

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**MARIANA ELIZABETH GUTIÉRREZ ZAMORA**

TUTOR: Dr. CARLOS SALVADOR GALINA HIDALGO

COMITÉ TUTORAL: Dr. SALVADOR ROMO GARCIA

Dr. ANTONIO PORRAS ALMERAYA

MÉXICO, D.F.

2009



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.



## CONTENIDO

<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract</b>	<b>IX</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>II. Revisión de literatura</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Desarrollo embrionario</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Evaluación morfológica de la calidad</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Técnicas no invasivas de evaluación embrionaria</b>	<b>7</b>
2.3.1 Evaluación microscópica	7
2.3.2 Cultivo de embriones	10
<b>2.4 Técnicas invasivas de evaluación embrionaria</b>	<b>12</b>
2.4.1 Determinación de muerte celular en embriones	13
2.4.2 Determinación de la proliferación celular en embriones	15
2.4.3 Microscopía electrónica	16
2.4.4 Microscopio confocal	17
<b>2.5 Factores que afectan la evaluación embrionaria</b>	<b>17</b>
2.5.1 El evaluador	17
2.5.2 Procedencia del embrión	19
2.5.3 Microscopio y magnificación	20
<b>III. Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>IV. Material y métodos</b>	<b>23</b>
<b>V. Resultados</b>	<b>29</b>
<b>VI. Discusión</b>	<b>41</b>
<b>VII. Conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>VIII. Literatura citada</b>	<b>50</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Código para el estado de desarrollo en embriones bovinos	<b>5</b>
<b>Cuadro 2.</b> Esquema del tratamiento de sincronización y superovulación	<b>24</b>
<b>Cuadro 3.</b> Nivel de concordancia de acuerdo al índice de kappa (k)	<b>28</b>
<b>Cuadro 4.</b> Índice de concordancia kappa, entre métodos de evaluación (estereoscópico, contraste de fases y TUNEL) para cada estadio de desarrollo.	<b>40</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución del grado de calidad embrionaria de acuerdo al estadio de desarrollo a la evaluación realizada por el microscopio estereoscópico	<b>29</b>
<b>Figura 2.</b> Distribución del grado de calidad embrionaria de acuerdo al estado de desarrollo a la evaluación realizada por el microscopio invertido de contraste de fases	<b>30</b>
<b>Figura 3.</b> Distribución del grado de calidad embrionaria de acuerdo al estado de desarrollo a la evaluación realizada por la técnica de TUNEL	<b>31</b>
<b>Figura 4.</b> Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (MEst vs MCF); en cuanto a calidad, de acuerdo al estado de desarrollo	<b>32</b>
<b>Figura 5.</b> Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (estereoscópico vs TUNEL) en cuanto a calidad, de acuerdo al estado de desarrollo	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (contraste de fases vs TUNEL) en cuanto a calidad de acuerdo al estado de desarrollo	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b> Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (estereoscópico, contraste de fases y TUNEL) en cuanto a calidad, de acuerdo al estado de desarrollo	<b>35</b>
<b>Figura 8a.</b> Cambios ocurridos según el método de evaluación utilizado en la clasificación de las mórulas. El grado de calidad se representa por la letra (B) bueno, (R) regular y (M) malo y el número de embriones evaluados para cada grado de calidad está entre paréntesis	<b>36</b>

- Figura 8b.** Forma en que ocurrieron los cambios por método de evaluación utilizado en la clasificación de los blastocistos tempranos y expandidos. El grado de calidad se representa por la letra (B) bueno, (R) regular y (M) malo y el número de embriones evaluados para cada grado de calidad está entre paréntesis. **37**
- Figura 9.** Embrión de buena calidad evaluado por microscopia de contraste de fases y B) el mismo embrión procesado por la técnica de TUNEL, la flecha marca una célula TUNEL positiva **38**
- Figura 10.** Mórula evaluada como de buena calidad por los tres diferentes métodos: A) microscopio estereoscópico, señalada por la flecha, B) contraste de fase y C)TUNEL , la flecha indica una célula TUNEL positiva **38**
- Figura 11.**Blastocisto evaluado como regular por el microscopio estereoscópico (A), por el contraste de fases (B) se evaluó como bueno y al realizar la técnica de TUNEL (C), se corroboró que efectivamente era de buena calidad. Las flechas señalan el embrión correspondiente en A y B **39**

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar las evaluaciones realizadas mediante el microscopio estereoscópico y el invertido de contraste de fases, con la finalidad de verificar, si efectivamente existe alguna diferencia significativa que ayude a tener mayor certeza en la evaluación basada únicamente en los parámetros morfológicos de los embriones, y reducir el porcentaje de embriones que son clasificados erróneamente por el microscopio estereoscópico. Veinte vacas *Bos indicus* de la raza Brahman fueron sometidas a un programa de sincronización y superovulación, inseminando artificialmente a las 12 y 24 horas después de iniciado el celo, realizándose la recolección de los embriones a los 7 días. Cincuenta y dos embriones fueron colectados, evaluados y seleccionados, de acuerdo a su estado de desarrollo y a su calidad, primeramente por el microscopio estereoscópico (MEst) y posteriormente por el invertido de contraste de fases (MCF), en mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos expandidos de buena, regular y mala calidad. Para la determinación de la concordancia entre los métodos de evaluación se utilizó la prueba de Kappa de Cohen. De esta manera, encontramos que entre el microscopio estereoscópico y el invertido de contraste de fases el valor de  $k = 0.61$  determinó que existe una buena concordancia entre ambos métodos para el grado de calidad; sin tomar en cuenta el estado de desarrollo y una concordancia moderada ( $k=0.46$ ) para el estado de mórula. En cuanto a la evaluación realizada por la técnica de TUNEL en los mismos embriones, el mayor porcentaje de las mórulas fueron evaluadas como de buena calidad (67%) comparadas con el 67% de las mórulas evaluadas como regulares por el MEst, lo que indica una baja concordancia, entre la técnica de TUNEL con el MEst ( $k= 0.17$ ) y pobre con el MCF ( $k= 0.22$ ). A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las evaluaciones realizadas mediante el MEst y el MCF, si se observó aumento en el número de embriones viables entre ambos métodos, siendo más evidente en la valoración realizada en el estadio de mórula de calidad regular. De acuerdo con las evaluaciones realizadas por los métodos morfológicos (MEst y MCF) y la técnica de TUNEL, se observaron diferencias significativas para los estadios de mórula y blastocisto temprano, lo que nos indica que entre más avanzado sea el estado de desarrollo del embrión, la evaluación morfológica tiende a ser mas precisa sin importar el método de evaluación empleado.

Palabras clave: *Bos indicus*, calidad embrionaria, evaluación morfológica, microscopio invertido de contraste de fases, apoptosis, TUNEL.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the assessments made by a stereo microscope and inverted phase contrast, with the aim of verifying whether there actually exists some significant difference that would provide more certainty in the assessment based solely on morphological parameters of the embryos and would help to reduce the percentage of embryos that are incorrectly classified by the stereoscopic microscope. Twenty cows of *Bos indicus* Brahman breed were subjected to a synchronization and super ovulation, by artificially inseminating them at 12 and 24 hours after the onset of estrus. Seven days later, fifty-two embryos were collected, classified and selected according to their stage of development and quality, first by a stereo microscope (MEst) and then by inverted phase contrast (MCF), in morula, early blastocysts and expanded blastocysts of good, regular and poor quality. In order to determine the concordance between assessment methods, Cohen's Kappa test was used. Within the study, it was found that with the value  $k = 0.61$  there is a good concordance between the stereo microscope and inverted phase contrast to the level of quality, without taking into account the stage of development. However, for the morula stage this relationship was found to be moderate ( $k=0.46$ ). In terms of the evaluation performed by TUNEL technique in the same embryos, a larger percentage of the morulas were identified as good quality (67%) in comparison to the 14% of the morulas that were evaluated as regular with the MEst, indicating a low concordance between the TUNEL and MEst ( $k=0.17$ ), and poor between the TUNEL and MCF ( $k=0.22$ ). In spite of the fact that there were no statistically significant differences between the evaluations carried out by MEst and MCF, it was observed that the number of viable embryos increased with both methods. This increase was most evident in the assessment made in the regular quality. According to the evaluations carried out with morphological methods (MEst and MCF) and the TUNEL technique, it was observed that significant differences exist for the early morula and blastocyst stages indicating that the more advanced the state of the embryo is, the more precise the morphological evaluation tends to be regardless of the evaluation method employed.

Key words: *Bos indicus*, bovine embryo quality, assessment of bovine embryo, apoptosis, TUNEL.





# ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE DOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN (MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO vs INVERTIDO DE CONTRASTE DE FASES) EN EMBRIONES DE GANADO *BOS INDICUS*.

## I. INTRODUCCIÓN

La tecnología de la transferencia de embriones (TE), se desarrolló en sus inicios con la finalidad de optimizar los recursos genéticos y económico de los hatos, teniendo su mayor auge en los años 70's (Hasler, 2006). En la actualidad se ha logrado una producción masiva de embriones que se recuperan en etapas tempranas del desarrollo, de esa manera las hembras de elevado valor comercial pueden producir un rango de 10 a 15 becerros por año, lo cual impulsa el mejoramiento de los hatos, obteniéndose hasta un 50% de incremento genético (Christensen, 1991). Sin embargo, la TE en las regiones tropicales no ha tenido el mismo éxito, en especial los resultados obtenidos en el ganado de tipo cebú (*Bos indicus*) ya que la eficiencia reproductiva en los programas de TE en los animales de este tipo, ha demostrado no ser tan buena como en el caso de los animales de tipo *Bos taurus*; presentando menores porcentajes de preñez (32-50%) (Montiel *et al*, 2006; Donaldson, 1984; Nogueira *et al*, 2002) en comparación con los *Bos taurus* (60-70%) (Wright, 1981; Spell *et al*, 2001; Hasler, 1992) con embriones transferidos en fresco; disminuyendo un 10% en embriones congelados (Dobrinsky, 2002, Spell *et al*, 2001; Hasler, 1992). También, se conoce que el número de embriones transferibles (buena calidad) obtenidos por donadora, es menor en los animales *Bos indicus* (Donaldson 1984; López *et al.*, 1995; Aguilar *et al.*, 2002; Neto *et al.*, 2004; Marquez *et al.*, 2005) que en los *Bos taurus* (Hasler *et al.*, 1983; Barrios *et al.*, 1982, Hasler 1992; Neto *et al.*, 2004); y que los embriones de *Bos turus* son de mejor calidad que los de *Bos indicus* (Cutini *et al.*, 2000). Aunado a lo anterior, cabe mencionar que la calidad del embrión expresa la viabilidad de este (Walker, 1989) y esto puede tener fuertes repercusiones en los programas de transferencia embriones. Teniendo como punto importante que la valoración óptica, no invasiva, de las particularidades de tamaño, forma, apariencia, simetría e intensidad del color de las células embrionarias, permite asignarle un valor

predictivo al éxito de la TE (Palma, 2008). No obstante, la técnica de evaluación embrionaria, por medio de microscopia estereoscópica, aunque es la más utilizada, se basa únicamente en la observación morfológica de los embriones, lo que la hace subjetiva; mostrando un rango de variación entre evaluadores alrededor del 32% (Farin *et al.*, 1995, Callesen *et al.*, 1995, Van Soom *et al.*, 1996 y De Leew, 1996), siendo más evidente en los embriones de tipo *Bos indicus*. Aguilar *et al.*, (2002) mostraron que la clasificación embrionaria, en este tipo de ganado, puede variar alrededor de un 27% entre la evaluación estereoscópica, que rutinariamente se realiza, y otro método más exacto como el microscopio electrónico, teniendo la desventaja de ser un método invasivo (Abe *et al.*, 1999, 2000). Sin embargo, estas diferencias en la evaluación de embriones de tipo *Bos indicus*, no se hacen evidentes en las evaluaciones realizadas cuando los embriones son de tipo *Bos taurus* (López-Demián *et al.*, 2008). Esto hace necesario que la evaluación de los embriones, en especial cuando se trata de animales de tipo cebú, sea lo más certero posible. Linares and King (1980) proponen la evaluación de los embriones bajo el microscopio de contraste de fases, como un método microscópico más eficiente, que podrían proporcionar información valiosa para mejorar la exactitud de los métodos de clasificación a través de la evaluación morfológica. Por lo que es esencial para el trabajo en un programa de TE el uso y desarrollo de una mejor técnica no invasiva, que se complemente a la observación con el microscopio estereoscópico, para determinar mejor cuales embriones pueden transferirse o congelarse con éxito y cuáles no.

El objetivo de este trabajo fue comparar entre las evaluaciones realizadas por el microscopio estereoscópico y el invertido de contraste de fases, con la finalidad de verificar, si efectivamente, existe alguna diferencia significativa que ayude a tener más certeza en la evaluación basada únicamente en los parámetros morfológicos de los embriones y reducir el porcentaje de embriones que son clasificados erróneamente por el microscopio estereoscópico.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### **2.1. Desarrollo embrionario**

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

En el embrión bovino, la primera segmentación se produce a las 48 horas después de haber sido fertilizado, para las 72 horas, tendrá 8 células, de 16 a 32 células a partir del día 5 denominándose mórula, después de esto, viene la compactación de los blastómeros dónde comienza la expresión de proteínas de adhesión celular como las Caderinas –E. De esta manera, los blastómeros se agrupan y forman una esfera compacta de células (Flemin *et al.*, 2001) estabilizada por uniones estrechas que se forman entre las células exteriores que sellan el interior del cúmulo celular; por lo que este cúmulo consiste en un grupo de células internas rodeadas por un grupo más grande de células externas (Barlow *et al.*, 1972). La mayoría de los descendientes de las células externas se convierten en las células del trofoblasto (trofoectodermo) que posteriormente dará lugar a la formación del corion (porción embrionaria de la placenta). Las células internas generan la masa celular interna (MCI), que darán origen al embrión y a su saco vitelino, alantoides y su amnios asociado. Así también la MCI mantiene activamente a las células del trofoblasto, secretando proteínas como FGF4 que hacen que las células del trofoblasto se dividan (Gilbert, 2005). Hacia el día 6 ó 7 se puede apreciar el proceso llamado cavitación; donde las células del trofoblasto secretan un fluido hacia la mórula para crear el blastocele. Las membranas de las células del trofoblasto contiene una bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa que reviste el blastocele y esta bombea iones de sodio hacia la cavidad central. La acumulación subsiguiente de estos iones atrae agua osmóticamente y amplía de este modo el blastocele (Borland 1977; Wiley 1984). En el desarrollo de un embrión de bovino de manera natural este proceso se

lleva a cabo aproximadamente hacia el día 9 cuando se produce la eclosión de la zona pelúcida (Shea 1981, Mohr and Trounson, 1982).

El embrión bovino denominado blastocisto, alrededor del día 7, tiene en promedio un diámetro de  $193.5 \pm 28.4 \mu\text{m}$ , presenta blastómeros pequeños y redondeados, a veces puede observarse que están separados por pequeños espacios intercelulares y la zona pelúcida presenta un aspecto rugoso (Fléchon and Renard, 1978). Es indispensable la integridad de la membrana plasmática de los blastómeros debido a que ésta funciona como una barrera selectiva con respecto al medio extracelular estableciendo y manteniendo de manera temporal el gradiente iónico, el pH, así como el intercambio de sustancias y mecanismos de transporte intracelular (Overström, 1996).

La etapa de desarrollo en la cual se encuentra el embrión, es importante tanto para el transporte y comercialización, como para la transferencia directa. En el transporte internacional solo son admitidos los embriones que contengan la zona pelúcida intacta (estado del 3-7) ver cuadro 1. Los cuales tienen la capacidad de sobrevivir a la congelación, método que facilita su comercialización (Mohr and Trounson 1981). En el caso de la transferencia embrionaria, se prefieren los embriones en estados de desarrollo más avanzados (estadios del 4-7), los cuales pueden colectarse a partir de los días 6 al 8 aproximadamente (IETS, 1998).

**Cuadro 1.** Código para el estado de desarrollo en embriones bovinos (IETS, 1998)

<b>Código</b>	<b>Estado</b>	<b>Descripción morfológica</b>
3	Mórula temprana	16-32 blastómeros, no compactados, la masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino.
4	Mórula compacta	32-64 blastómeros compactados que ocupan del 60-70% del espacio perivitelino
5	Blastocisto temprano	100-200 células. Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido de las células del trofoectodermo y por la formación del blastocele, el cual es <50%. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna MCI
6	Blastocisto	Existe una marcada diferenciación de las células del trofoblasto, que forma una pared adosada a la zona pelúcida (ZP) y la MCI. El Blastocele es >50%
7	Blastocisto expandido	Más de 200 células. El diámetro del embrión aumenta considerablemente ocasionado por el incremento en la presión osmótica dentro del blastocele, al mismo tiempo que la ZP comienza a ser más delgada.
8	Blastocisto en eclosión	Por el día 8-9 después de la fertilización, viene la ruptura de la ZP, causada probablemente por el incremento de la presión del embrión y el proceso enzimático iniciado por las células del trofoblasto. Embrión parcialmente eclosionado
9	Blastocisto eclosionado	Embrión totalmente eclosionado, hay un incremento en el tamaño, su forma puede ser esférica o el blastocele colapsado, ya no presenta ZP

## **2.2 Evaluación morfológica de la calidad**

La clasificación de embriones sirve como herramienta para evaluar la calidad del embrión basándose en la comparación de una serie de parámetros como son el número, tamaño y forma de los blastómeros, color, forma e integridad de la zona pelúcida, siempre teniendo en cuenta que el estado de desarrollo debe concordar con el día de colecta (sexto o séptimo día) en los embriones producidos *in vivo*.

Los embriones han sido clasificados y evaluados por diversos investigadores, de acuerdo a la apreciación de estos parámetros. Linares y King (1980) agruparon a los embriones en tres categorías: normal, en proceso de degeneración y degenerados. Tiempo después Linder and Wright (1983), redefinieron para tener un mejor entendimiento de la evaluación embrionaria, sus criterios aumentando una categoría. Así, los embriones excelentes, son aquellos que son ideales, con forma esférica, 4 células simétricas y uniformes en color, tamaño y textura, y la zona pelúcida debe estar intacta. En los embriones buenos, se observan pequeñas imperfecciones, como algunos blastómeros extruídos, forma irregular y algunas vesículas. Los regulares presentan blastómeros extruídos con presencia de vesículas e incluso algunas células degeneradas y finalmente los malos, son aquellos que muestran mayor número de irregularidades morfológicas, es decir, un gran número de blastómeros extruídos, células degeneradas, variación en el tamaño de los blastómeros, numerosas vesículas. Sin embargo la masa celular aún parece viable y pueden también presentar ruptura en la zona pelúcida.

Más adelante Kuzan (1988) agrupó a los embriones en seis categorías: excelente, bueno, regular, malo, degenerados y ovocitos sin fertilizar. Sin embargo, esta propuesta no presentó ninguna ventaja sobre las anteriores, por lo que no ha sido tan utilizada como la de Linder y Wright (1983). Por último en 1998, Robertson y Nelson publicaron el manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS por sus siglas en inglés). Presentando de forma numérica las características de calidad, basándose también en la

integridad morfológica. Los códigos para la calidad embrionaria son los siguientes: grado 1 (excelente o bueno), es un embrión simétrico y esférico con blastómeros bien definidos, con irregularidades relativamente menores al 85% del material celular y la zona pelúcida intactos así como, la masa embrionaria viable, así como, la zona pelúcida debe estar intacta. El grado 2 (regular), donde los embriones presentan una cantidad moderada de irregularidades, al menos el 50% del material celular debe estar intacto y la masa embrionaria viable. El grado 3 (malos), en estos embriones, por lo menos el 25% del material celular intacto y la masa embrionaria viable, puede haber ruptura de la zona pelúcida. Finalmente, el grado 4 (muertos o degenerados) corresponde a embriones degenerados, de una célula u ovocitos: no son viables.

Aunque el examen morfológico no constituye una prueba absoluta de viabilidad, la importancia de la evaluación embrionaria radica en la presencia de diferencias significativas en el porcentaje de gestación cuando se transfieren embriones de calidad excelente o buena (60%) comparado con el porcentaje obtenido al transferir embriones de mala calidad (<30%) así como, los porcentajes de gestación obtenidos con diferente estadio de desarrollo, observándose mayores tasas de gestación cuando se transfieren embriones en etapa de blastocistos (Lindner y Wright 1983, Hasler *et al.*, 1987, López *et al.*, 1995, Cutini *et al.*, 2000).

## **2.3 Técnicas no invasivas de evaluación embrionaria**

### **2.3.1 Evaluación microscópica**

Frecuentemente la observación estereoscópica, por medio de microscopía de luz como es el caso del microscopio invertido de contraste de fases, es usada para las evaluaciones del desarrollo y calidad de los embriones sin interferir con su desarrollo normal o su viabilidad (Van Soom *et al.*, 1997).

Dentro de los parámetros más importantes a tomar en cuenta en las evaluaciones de la morfología embrionaria están la integridad de la zona pelúcida, el tamaño y forma de los blastómeros, presencia de células extruidas o fragmentación, compactación, color del embrión y el estado de desarrollo; además de que estos deben de concordar con el tiempo a partir del cual ocurrió la fertilización (Merton, 2002)

La zona pelúcida (ZP) es la cubierta extracelular formada por glicoproteínas, la cual rodea al embrión de los mamíferos entre el estadio de cigoto hasta la etapa de blastocisto expandido, previene la dispersión de los blastómeros apoyando la compactación de los mismos (Jun *et al.*, 1998). El grosor de la ZP en la mayoría de los mamíferos tiene un promedio de 10µm (Betteridge 1995). Sin embargo, el grosor de la ZP en las mórulas compactas no puede ser usado como criterio de evaluación de la calidad embrionaria ya que es muy similar el tamaño en los diferentes grados de calidad (Abe *et al.*, 2002). No obstante, el grosor de la ZP tiende a disminuir con el desarrollo del embrión debido a la expansión del blastocele y esto si puede ser más usado como marcador de la calidad embrionaria.

El color de los blastómeros debe ser ámbar, con una tonalidad uniforme. Esta característica se relaciona con la presencia de vesículas intracitoplasmáticas, por lo que la transparencia citoplasmática, va depender de la especie involucrada; por ejemplo, los animales domésticos en comparación con los embriones humanos o de roedores, presentan un mayor número de gotas lipídicas en el citoplasma que da como resultado embriones más oscuros que no permiten la observación de estructuras importantes tales como los núcleos, nucléolos y algunos orgánulos; ya que el alto contenido de lípidos. Esto también, puede presentar mayores problemas para la congelación (Abe *et al.*, 2002) y bajos niveles de sobrevivencia al ser transferidos (Dorland *et al.*, 1990; Noriega *et al.*, 1995; Van Soom *et al.*, 2003; Leroy *et al.*, 2005). Por lo que se sugiere que la selección morfológica de embriones de mayor calidad, debe estar relacionada con una menor cantidad de gotas lipídicas, las cuales pueden ser cuantificadas utilizando el Sudan Negro

como tinción (Abe *et al.*, 2002, Leroy *et al.*, 2005). Pero hasta ahora, solo la estimación de la opacidad citoplasmática puede ser utilizada para cuantificar el contenido de lípidos de forma no invasiva en embriones bovinos.

Los blastómeros extruidos o en vías de fragmentación, esta característica podría indicar ciertas alteraciones en 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. La presencia de células extruídas o fragmentos celulares pueden ser considerados como indicativos de una pobre o mala calidad del embrión (Linder y Wright 1983). En los bovinos y porcinos la fragmentación sólo se evalúa en estadios de mórula o blastocisto. Hardy y Spanos (2002) sugieren que la presencia de fragmentos citoplasmáticos podrían ser un marcador no invasivo de muerte celular programada o apoptosis en los embriones cuando ocurre de forma excesiva, especialmente en la masa celular interna. Lo anterior puede ser perjudicial en el potencial de desarrollo embrionario. Sin embargo, la relación entre la fragmentación y la apoptosis es más subjetiva en embriones humanos (Hardy 1999; Jursicova *et al* 2003). Ikeda *et al.*, (2006) mencionan que existe la posibilidad de que la fragmentación embrionaria se deba a la asimetría en la división celular, no al proceso de apoptosis. En otro estudio se mostró que el índice de células apoptóticas fue el mismo en mórulas que presentaban un 50% más de fragmentación, indicando que la apoptosis y la fragmentación pueden ocurrir como procesos independientes (Van Soom *et al.*, 2003). Al respecto, Antunes *et al.*, (2008) menciona que el índice de apoptosis como parámetro para medir la calidad embrionaria es superior a la fragmentación.

Durante el proceso de compactación, el embrión recibe el nombre de mórula. Esta categoría a su vez se divide en mórula temprana, cuando aún no se ha llevado a cabo por completo el proceso; y mórula compacta cuando el proceso ha finalizado. En los bovinos, el proceso de compactación se inicia cuando el embrión esta en un estadio de 32 células, tanto en embriones producidos *in vivo* como los producidos *in Vitro* (Van Soom *et al.*,

1996), entre los días cinco y seis después de la fertilización. Este proceso se inicia con la formación de uniones estrechas “*tight junctions*” entre los blastómeros (Van Soom *et al.*, 1997). La formación de estas uniones aunado al encogimiento de los blastómeros, resulta en un embrión más redondeado y compactado con mayor espacio perivitelino. Morfológicamente esto significa que va a ser más difícil observar las células de forma individual y que solo podremos observar al embrión como un cúmulo de células. Esta compactación es menos obvia en los embriones producidos *in Vitro* (Hasler *et al.*, 1995 Van Soom *et al.*, 2002). La reducción en el tamaño del espacio perivitelino es un indicador de la mala calidad de un embrión en estadio de mórula, y esto puede estar relacionado con una menor compactación de la mórula. Así también, la presencia de detritus celulares es más difícil de detectar cuando el espacio perivitelino es reducido, lo cual se presenta más en embriones bovinos y ovinos producidos *in Vitro* (Rizos *et al.*, 2002)

### 2.3.2 Cultivo de embriones

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

El desarrollo embrionario *in Vitro* es influenciado por diversos factores como la adición de antioxidantes y oxígeno; además el número de embriones en medio de cultivo es importante, ya que el desarrollo de los embriones es más satisfactorio cuando son cultivados en grupo que de manera individual. Esto puede explicarse a la secreción de factores de crecimiento por los mismos embriones que probablemente promuevan el desarrollo de los demás (Pereira *et al.*, 2005). En cuanto al metabolismo embrionario, se han logrado evaluar parámetros entre los que se encuentra la glucosa, que es necesaria para la formación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas durante el desarrollo; de esta

forma se ha reportado que a mayor concentración de glucosa, aumenta la posibilidad de viabilidad posterior a la transferencia (Gardner and Leese, 1987).

En la actualidad existen muchas formas para medir el metabolismo embrionario, en general podemos clasificarlas en dos categorías:

- a) Las técnicas basadas en la evaluación de los cambios en la composición de los medios de cultivo como son los sustratos energéticos, hormonas, factores de crecimiento y oxígeno, entre otros.
- b) Técnicas basadas en el uso de marcadores, sustratos fluorescentes o tinturas

Sólo la primera categoría puede ser considerada como verdaderamente no invasiva, esta se basa en un principio simple, en el cual el embrión es puesto en pequeños volúmenes de medio de cultivo, y sólo se observan los cambios en la concentración de ciertos componentes como glucosa, lactato, piruvato, hormonas como el interferon tau (IFN- $\tau$ ); prostaglandinas (PG); factores de crecimiento como el TGF $\beta$ , oxígeno, entre otros (Donnay *et al.*, 1997).

La segunda categoría, se refiere a pruebas más sensibles que llevan a la evaluación de algunas rutas metabólicas. Sin embargo, el sustrato de los marcadores que se les adicionan puede ser tóxico para las células. Asimismo, la exposición a los rayos UV o a radioactividad puede interrumpir el posterior desarrollo embrionario o afectar su calidad (Goto *et al.*, 1993), limitando la aplicación de este tipo de técnicas previo a la transferencia de los embriones.

En conclusión, se puede mencionar que con el uso de un medio de cultivo pueden ser evaluadas diferentes características como morfología, etapa y grado de desarrollo de los embriones, así como, su calidad. Sin embargo, uno de los problemas en la utilización de estas técnicas de evaluación, previas a la transferencia de embriones o a la criopreservación, radica en que son pruebas delicadas y de altos costos, que requieren de

equipo especial y personal capacitado. Así también, la falta de sensibilidad de ciertas técnicas, las hace inaplicables en embriones individuales. Sin embargo, existen trabajos dónde se señala al medio de cultivo resulta efectivo para evaluar la viabilidad y calidad de los embriones recién descongelados para su transferencia (Contreras *et al.*, 2008).

Otra herramienta utilizada en la producción de embriones *in Vitro*, se basa en el tiempo de desarrollo embrionario, pudiendo evaluar la viabilidad y calidad; por ejemplo, el tiempo de formación del blastocisto esta correlacionado con el número de células (Van Soom *et al.*, 1997) y la resistencia a la congelación (Dinnyes *et al.*, 1999).

#### **2.4 Técnicas invasivas de evaluación embrionaria**

Las técnicas invasivas para la evaluación de la calidad embrionaria, por lo regular conlleva algún tipo de fijación, coloración o segmentación del embrión. Generalmente son utilizadas para evaluar el estado de las diferentes estructuras celulares: núcleo, mitocondrias, cromosomas, citoesqueleto y organelos. Por ejemplo, en el núcleo, se puede cuantificar el grado de muerte celular o el índice apoptótico por medio de la técnica de TUNEL (Byrne *et al.*, 1999) o el índice de proliferación celular por la técnica de BrdU, para monitorear la síntesis de DNA en la fase S del ciclo celular (Moussa *et al.*, 2005) y de esta manera medir la calidad embrionaria. El estado mitocondrial puede ser evaluado por medio del microscopio confocal (Barnett *et al.*, 1997), al igual que la distribución de actina y tubulina en el citoesqueleto (Long *et al.*, 1998). La observación ultraestructural por medio del microscopio electrónico, es otra herramienta muy utilizada para la evaluación de la calidad de los embriones (Linares and Plöen, 1981; Visintin *et al.*, 2002; López- Demian *et al.*, 2008).

#### 2.4.1 Determinación de muerte celular en embriones

Uno de los parámetros que ha ayudado a conocer más los mecanismos de desarrollo embrionario en etapas tempranas, es la muerte celular programada (MCP). Este término, ha sido propuesto para indicar la eliminación de células específicas en un tiempo y un lugar predeterminado. Se ha descrito como un mecanismo de auto eliminación celular, disparado por alguna señal específica o debido a una falla en la expresión morfológica y/o bioquímica de la célula (Fabian *et al.*, 2005). Existen varios tipos de MCP, dentro de los cuales el que mejor se ha descrito es la apoptosis, cuyos signos típicos son el resultado final de una compleja cascada de eventos bioquímicos (Bröker *et al.*, 2005). Morfológicamente, durante el proceso de apoptosis, la célula se va a contraer volviéndose más densa por la condensación citoplasmática, marginación, condensación y fragmentación de la cromatina; va existir un aumento brusco de la densidad intracelular y una dilatación del retículo endoplásmico. Debido a esto, se forman vesículas que se fusionan con la membrana plasmática, eliminando su contenido al medio extra celular. Así también, se presenta un incremento moderado, pero sostenido de las concentraciones de calcio libre citoplasmático; cambios en la composición de la membrana celular y alteración en los componentes del citoesqueleto (Jordán, 2003). Bioquímicamente, hay proteínas importantes de la célula que van a ser degradadas, fragmentando el DNA, habiendo exposición de la fosfatidil serina y formación de cuerpos apoptóticos (Leits *et al.*, 2001; Jaattela, 2004; Bröker *et al.*, 2005).

La apoptosis durante el desarrollo embrionario ha jugado un papel importante, presentándose de manera normal, para la eliminación de células anormales. En el caso de los bovinos, a partir de 8 a 16 células (Byrne *et al.*, 1999) hay un incremento en la incidencia de la muerte celular que puede ser un indicador de un inadecuado medio para los embriones producidos tanto *in vivo* como *in Vitro* (Betts *et al.*, 2001; Makarevich *et al.*, 2002), y ser la causa de las pérdidas embrionarias en las etapas temprana del desarrollo (Matwee *et al.*, 2000). Dentro de las posibles causas se encuentran: anomalías

nucleares y/o cromosomales (multiploidia o mosaicismo), lo cual indica un inapropiado potencial del desarrollo (Fabian *et al.*, 2005); desbalance en la secreción de factores de crecimiento como el insulínico (IGF-1, IGF-II) o “Sobrevivencia” transforming growth factor (TGF $\alpha$ ), factor de activación plaquetario (PAF) y ciertas hormonas (Makarevich *et al.*, 2002; Fabian *et al.*, 2005) y/o la exposición a ciertos factores dañinos para las células (especies oxígeno reactivas, ROS); radiaciones UV, estrés calórico o por congelación (Fabian *et al.*, 2005). Por tanto, la apoptosis puede ser un indicador de la calidad embrionaria (Byrne *et al.*, 1999).

Sin embargo, hay pocos informes sobre el tipo de señales que disparan la apoptosis en los embriones o el mecanismo por el cual este mecanismo es controlado (Ginger *et al.*, 1999; Matwee *et al.*, 2000). A pesar de la vasta variedad de señales, al parecer la mayoría de las rutas que llevan a la célula a sufrir de apoptosis, terminan en la activación de ciertas caspasas pertenecientes a la familia de las proteasas (Leits *et al.*, 2001; Jaattela, 2004; Bröker *et al.*, 2005). La actividad de las caspasas es regulada por proteínas de la familia BCL-2 (Ginger *et al.*, 1999; Leits *et al.*, 2001; Jaattela, 2004; Bröker *et al.*, 2005). Al menos en mamíferos, se han identificado 15 miembros de esta familia que se ha dividido en dos subgrupos: aquellos que tienen efectos anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-W, BCL-XL, A1, MCL-1) y los pro-apoptóticos (BAX, BIM, BAK, BOK, BAD, BID, BCL-S, BNI-3). En la mayoría de los casos la relación entre estos miembros dentro de la célula van a determinar si esta vive o muere (Ginger *et al.*, 1999; Leits *et al.*, 2001; Jaattela, 2004; Bröker *et al.*, 2005).

Existen diversas técnicas utilizadas para la detección de los procesos de apoptosis, basadas fundamentalmente en los cambios morfológicos y moleculares existentes dentro de las células. Una de las técnicas más empleadas es la de TUNEL. Esta metodología detecta la fragmentación del ADN *in situ*. Durante la fase final del proceso apoptótico, el núcleo puede romperse formando fragmentos nucleares picnóticos. Los cuerpos apoptóticos son envueltos por la membrana citoplasmática y son fagocitados por macrófagos o células vecinas (Betts and King 2001). La técnica de TUNEL, se basa en la

marcación por medio de fluorescencia por el extremo final 3' de los fragmentos de oligonucleosomas; teniendo como ventaja que además de saber la localización de los fragmentos apoptóticos se puede realizar la cuantificación del porcentaje de núcleos con el ADN fragmentado (Gavrieli *et al.*, 1992). De este modo, los núcleos TUNEL positivos pueden ser vistos por medio de un microscopio acoplado con fluorescencia.

Existen otras técnicas para la detección de apoptosis, como: el uso de fluorocromos capaces de intercalarse en el ADN que permiten visualizar por medio del microscopio, la morfología de la cromatina. Estos colorantes como etidio, propidio y *Hoechst*, son utilizados con frecuencia en citometría de flujo. La microscopía electrónica permite la visualización en detalle de la cromatina, fragmentación nuclear, formación de vacuolas, condensación citoplasmática y la fagocitosis, sin necesidad de tinciones específicas. La electroforesis en geles de agarosa de ADN aislado de cultivos celulares, permiten el análisis de la integridad del genoma. El marcaje de la fosfatidilserina en el lado extracelular de la membrana citoplasmática por medio de la proteína annexina V (Jordán, 2003). La expresión de caspasas (familia Bcl2) por medio de RT-PCR (Jursicova *et al.*, 1998). La expresión de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico por medio de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (Matwee *et al.*, 2000).

#### 2.4.2 Determinación de la proliferación celular en embriones (BrdU)

Otro parámetro que puede ser de ayuda para medir la calidad embrionaria y no muy estudiado, es el índice de proliferación celular, el cual puede ser evaluada por la presencia del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que es un marcador específico de la fase S del ciclo celular y es un componente esencial de la maquinaria de reparación y replicación del DNA (Makarevich *et al.*, 2002). La incorporación de 5'bromo2'deoxyuridine (BrdU) se ha utilizado para monitorear la síntesis de DNA (en la fase S) y la proliferación celular por inmunocitoquímica (Moussa *et al.*, 2005). La incorporación de BrdU representa una técnica de alta resolución para determinar el número de células individuales que están sintetizando DNA en un determinado periodo. En este método es

incorporado la BrdU dentro del nuevo DNA sintetizado por la célula en la fase S del ciclo celular (Moussa *et al.*, 2005). De esta manera, se puede marcar la progresión de la célula dentro y a través de la fase S del ciclo; esto es importante en la regulación de la síntesis de DNA y su proliferación celular. Se han realizado trabajos en los cuales el índice de replicación del DNA en caprinos es menor ( $85\pm 5$ ) al de equinos ( $319\pm 60$ ) (Moussa *et al.*, 2005). En este estudio realizado en cabras, se observó mediante el uso de la doble tinción, que la longitud de la fase S es aproximadamente de 7 h y de 14 a 24 h la del ciclo celular. El índice de proliferación después de 1h de cultivo en BrdU fue de  $42.9\pm 23.1\%$ . Los resultados hallados en embriones caprinos indican una fuerte correlación entre el índice de proliferación celular y la calidad embrionaria (Moussa *et al.*, 2005). Sin embargo, no existen estudios actuales que muestren el índice de proliferación celular en embriones bovinos.

#### 2.4.3 Microscopía electrónica

La microscopía electrónica de transmisión, es otro de los métodos más utilizados para valorar la calidad embrionaria de forma ultraestructural. Sin embargo, presenta algunas limitaciones: aunque el microscópico ofrece una mayor resolución por si mismo, la tercera dimensión esta casi eliminada por el examen de la secciones extremadamente delgadas del objeto a evaluarse. Sin embargo, la desventaja más importante que presenta, es que es un método sumamente invasivo, ya que requiere de la fijación, infiltración de resina y seccionado de los embriones. Aunque, son este tipo de investigaciones las que han tenido la experiencia de revelar ciertas estructuras que ofrecen un conocimiento mucho más detallado de la estructura embrionaria que la evaluación hecha por el microscopio estereoscópico (Maddox-Hytetel *et al.*, 2002), al tener ya criterios ultraestructurales de clasificación para los embriones de acuerdo al grado de calidad: buenos regulares y malos (Chartrain y Picard, 1988). Así también, la microscopía electrónica permite la observación de diferencias entre los embriones producidos *in vivo* e *in vitro*, en idénticos estadios de desarrollo, y embriones producidos *in vitro* (EPIV) en función del medio de cultivo.

#### *2.4.4 Microscopio confocal*

Otra de las herramientas frecuentemente utilizadas para la evaluación de la calidad embrionaria ha sido el microscopio confocal, ya que por medio de este, se pueden observar los embriones intactos, así como secciones gruesas sin necesidad de hacer cortes histológicos, por lo que se obtiene un aumento notable en la resolución, especialmente en muestras con fluorescencia y permite hacer reconstrucciones tridimensionales más precisas de mejor calidad y en menor tiempo que por otros métodos (Soto, 1993). Sin embargo, hay que tomar en cuenta, que es una técnica invasiva y no compatible con la posterior supervivencia de los embriones y que este tipo de tecnologías se reserva, por sus costos, a fines de investigación (Greve and Callesen, 2004).

### **2.5 Factores que afectan la evaluación embrionaria**

La evaluación embrionaria basada únicamente en los parámetros morfológicos, resulta ser un método subjetivo. Aunque se han establecido ciertos parámetros o reglas confiables, utilizadas internacionalmente, la variabilidad entre las evaluaciones siempre está presente. Dentro de los factores que afectan la evaluación se encuentran: el evaluador, la donadora o fuente productora del embrión, el tipo de microscopio y el aumento al que son evaluados los embriones.

#### *2.5.1 El evaluador*

Para reducir la variación entre evaluadores, es benéfico el uso de un sistema simple de clasificación de embriones (Farin *et al.*, 1995). No obstante, resulta difícil para los técnicos estar de acuerdo en asignar un grado específico a los embriones colectados in vivo (Shea, 1981, Callesen *et al.*, 1995, Farin *et al.*, 1995, Farin *et al.*, 1999). Sin embargo, es interesante observar excelentes concordancias entre evaluadores, encontradas al diferenciarse embriones degenerados de aquellos que no lo estaban (Farin *et al.*, 1999). La

variación entre evaluadores recae más bien en el grado de calidad de los embriones, mientras que la evaluación en cuanto a estado de desarrollo es menos frecuente que ocurra discrepancia (Callesen *et al.*, 1995, Farin *et al.*, 1995, Van Soom *et al.*, 1996, Van Wagtendonk-de Leeuw 1996)

Al considerar el estado de desarrollo y calidad embrionaria por separado, sólo el grado de calidad es significativamente influenciado por el evaluador (Callesen *et al.*, 1995), hallazgo 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) determinaron que la concordancia entre evaluadores para asignar la calidad es pobre. Por otra parte De Leeuw (1996) 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.

Aguilar *et al* (2002) En este estudio, se les asignó a cada embrión un grado de calidad, por medio de microscopía estereoscópica y se volvieron a clasificar a los embriones a nivel ultraestructural con la ayuda de microscopía electrónica de transmisión, mostrando que la clasificación asignada a los embriones *Bos indicus* es inexacta. Encontraron que el 51% de los embriones clasificados como buenos por el primer método, al ser evaluados por microscopía electrónica 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 calidad correcta y que el principal problema de la clasificación se encuentra en los embriones de calidad regular los cuales son confundidos con buenos y malos.

### 2.5.2 Procedencia del embrión

#### a) Embriones producidos *in vivo* (donadora)

Dentro de las fuentes significativas de variación de la calidad embrionaria, se encuentra la donadora, tanto en la raza como la edad de ésta, estableciendo el número y calidad de los embriones colectados. Donaldson (1984) determinó que las mejores razas para la producción de embriones son: Brangus (16), Simbrah (16) y Beefmaster (13), de los cuales sólo 6 embriones en promedio eran transferibles; mientras que para la raza cebú eran 3 (Donaldson 1984, Aguilar *et al.*, 2002, Marquez *et al.*, 2005). Otros estudios muestran que también para la raza Holstein, el promedio de embriones transferibles es de 6 (Hasler *et al.*, 1983; Neto *et al.*, 2004). Se ha reportado que *Bos indicus* presenta un mayor número de embriones transferibles que *Bos taurus* (López *et al.*, 1995), aunque en los *Bos taurus* los embriones suelen ser de mejor calidad (Putney *et al.*, 1988).

Otro factor importante que afecta la calidad embrionaria es la edad de la donadora, ya que se han realizado trabajos que muestran que al incrementar la edad disminuye tanto el número de ovulaciones como la calidad embrionaria (Lerner *et al.*, 1986; Hasler *et al.*, 1983).

Las comparaciones realizadas entre vacas y novillas de la raza Holstein, muestran que solo el 13% de los embriones de vacas fueron categorizados como de buena calidad en comparación con el 63% de las novillas (Leroy *et al.*, 2005, Sartori 2002). Sin embargo, cuando se utilizan hembras prepúberes (3 meses), la edad influye de forma negativa con respecto a la calidad embrionaria, por la baja capacidad de desarrollo del ovocito comparado con el de las vacas (Driancourt *et al.*, 2001).

#### b) Embriones producidos *in Vitro*

Los embriones producidos *in Vitro* (EPIV) presentan una mayor dificultad para ser evaluados que los producidos *in vivo*. Esta tendencia se ha mostrado en varios estudios,

donde la concordancia entre evaluadores fue siempre menor en los embriones bovinos producidos *in Vitro* (Farin *et al.*, 1995, Farin *et al.*, 1999). Uno de los aspectos involucrados en esto, es que en los EPIV hay un incremento en la heterogeneidad tanto en estado como en calidad (Van Soom *et al.*, 1996) sugestivo de que el sistema de cultivo altera varias de las características morfológicas. Con respecto a las alteraciones morfológicas *in Vitro* encontradas en los embriones. Shamsuddin and 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 inmaduras, todo esto en ambos tipos de células (de la masa celular interna y del trofoblasto). 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 (12 $\mu$ m) comparado con el tamaño original (30 $\mu$ m) 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. Ushijima *et al.*, (1999) observaron que al centrifugar a los embriones para retirar las gotas lipídicas presentes en estos, aumenta el éxito en la criopreservación.

### 2.5.3 Microscopio y magnificación

En relación al método de clasificación tradicional, es decir al microscopio estereoscópico, diversos autores han propuesto el uso del microscopio invertido de contraste de fases para la evaluación embrionaria, y de esta manera tener una mejor apreciación de los embriones en comparación con el estereoscópico, así como, en la asignación de la calidad y por lo tanto un aumento en éxito de los porcentajes de preñez en la transferencia

embrionaria (Linares and King 1980, Linares and Plöen 1981, Dorland 1990). En el año 1935, Fritz Zernike desarrolló el microscopio de contraste de fases para contrarrestar parte de las limitantes en la observación de especímenes vivientes. Los detalles de un objeto en el microscopio óptico estándar se ven debido a que los objetos tienen partes de diferente densidad; por lo tanto, ciertos especímenes como los embriones, son difícilmente distinguibles. El contraste de fases es especialmente útil para observar especímenes transparentes, debido a que hace distinguibles detalles que no pueden ser vistos con el microscopio estándar (Soto, 1993). Así también es una herramienta útil para evaluar mórulas y blastocistosis producidos *in Vitro* como método no invasivo de evaluación (Abe *et al.*, 1999, 2002).

Se puede realizar una mejor evaluación de las estructuras y de la calidad embrionaria por medio del microscopio electrónico (Chartrain y Picard, 1988) o el microscopio confocal (Byrne *et al.*, 1999; Matwee *et al.*, 2000), estos métodos de evaluación presentan la gran desventaja que va de por medio la viabilidad de los embriones.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente estudio fue evaluar de manera comparativa la calidad morfológica y el grado de desarrollo de embriones de *Bos indicus*, mediante el uso del microscopio estereoscópico e invertido de contraste de fases con la finalidad de verificar la clasificación realizada en este tipo de embriones.

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar la eficiencia de la técnica en la evaluación de la calidad embrionaria por microscopía estereoscópica con la evaluación en el microscopio invertido de contraste de fases, para determinar la concordancia entre la clasificación de las características de calidad y de grado de desarrollo de embriones *Bos indicus*
2. Determinar el grado de muerte celular (apoptosis) en los embriones para verificar si existe alguna diferencia en la calidad de los embriones que al ser evaluados por ambas técnicas mostraron alguna diferencia en cuanto a su calidad

#### 3.3 HIPÓTESIS

El microscopio invertido de contraste de fases permite evaluar más precisamente la calidad embrionaria que el microscopio estereoscópico

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Fase de campo

#### 4.1.2. Localización

La producción de embriones se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) propiedad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; rancho “El Clarín”, localizado en el estado de Veracruz, a una altura de 151msnm, en el Km 5.5 de la carretera federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan y rancho “La Soledad” localizado en el Km 3.5 del camino vecinal Mtz. de la Torre-Novara, en el Municipio de Martínez de la Torre. El clima de esta zona es cálido húmedo con una temperatura y precipitación media anual de 23.4°C y 1840 mm, respectivamente. Así también, se trabajo en el rancho particular “Flor de María”, ubicado en el municipio de Tuxpan, Veracruz; a 10 msnm, clima tropical, con una temperatura promedio anual de 24 °C y en el rancho “Lindavista”, municipio del Álamo, Veracruz.; localizado a 40 msnm, su clima es cálido-extremoso, la temperatura promedio anual es de 24°C y su precipitación previa anual es de 1,391 mm.

#### 4.1.2. Animales

Se utilizaron 20 hembras Cebú de la raza Brahman (*Bos indicus*), cuyas edades fluctuaban entre 3 y 7 años, con una condición corporal entre 2.5 a 3.5 puntos en la escala del 1 al 5 propuesta por Edmonson *et al.*, (1989). Estas hembras fueron sometidas a una evaluación ginecológica mediante palpación rectal, para corroborar que no estuvieran gestantes así como, que se encontraban ciclando y libres de alteraciones anatómicas así como fisiológicas que pudiera afectar su fertilidad.

#### 4.1.3. Superovulación e inseminación artificial

Las hembras se sincronizaron mediante la aplicación de dos inyecciones de 25mg de PGF2 $\alpha$  (Lutalyse, Pfizer México) para inducir la aparición del celo (día 0). La segunda aplicación de prostaglandina se realizó a los 14 días. Las vacas que presentaron celo (permitir la monta por otra hembra) fueron sometidas al proceso de superovulación, a través de la aplicación de 240mg de la hormona folículo estimulante FSH-P1 (Folltropin-V® BIONICHE), cada 12 horas (am-pm) en dosis decrecientes (cuadro 2) durante los días 9, 10, 11, y 12 del ciclo estral (Lindsell *et al.*, 1986); en el día 11 por la tarde y en el 12 por la mañana se aplicaron 25 mg de PGF2  $\alpha$  para la inducción del celo, los días 13 y 14 se realizó la inseminación artificial a las 12 y 24 horas posterior a la detección del celo. Los animales fueron inseminados con semen congelado de toro Brahman. La recolección de embriones se llevó a cabo por medio de lavados uterinos, no quirúrgicos, 7 días posteriores a la primera inseminación. Una vez terminada la recolección de las hembras donadoras se les administraron 25mg de prostaglandina con la finalidad de provocar la lisis del cuerpo lúteo.

**Cuadro 2.** Esquema del tratamiento de sincronización y superovulación

<b>PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN Y SUPEROVULACIÓN</b>		
DÍA	<b>Sincronización</b>	
1	PGF2 $\alpha$ 25 mg	
14	PGF2 $\alpha$ 25mg	
16-17 (estro=día cero)	Detección de celos	
<b>Superovulación</b>		
	<b>AM</b>	<b>PM</b>
9	50mg FSH	50mg FSH
10	40mg FSH	40mg FSH
11	30 mg FSH + 25mg PGF2 $\alpha$	30mg FSH + 25mg PGF2 $\alpha$
12	20mg FSH 25mg PGF2 $\alpha$	20mg FSH
13	Detección de celos e inseminación.	
14		
21	<b>Recolección de Embriones</b>	

## 4.2. Fase de Laboratorio

### 4.2.1. Evaluación de los embriones

Después de colectados, los embriones fueron evaluados y clasificados en fresco, por un técnico con amplia experiencia, primeramente con microscopio estereoscópico (Stereo Zoom®) se realizó la búsqueda a un aumento de 15x y la evaluación a un aumento de 45x, posteriormente fueron evaluados y clasificados con el microscopio invertido de contraste de fases (Olympus CKX 31) con el objetivo 40x por un técnico diferente. Ambas evaluaciones se hicieron de acuerdo a los criterios establecidos para embriones, buenos, regulares y malos por Lindner y Wright (1983).

### 4.2.2. Criterios de calidad para la evaluación por microscopía estereoscópica

**Calidad 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 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 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. No es recomendable la transferencia de estos embriones.

**Muertos y no fertilizados.** Embriones degenerados, en estado retrasado de desarrollo: no viables y ovocitos.

#### 4.2.3. Congelación

Una vez evaluados los embriones fueron congelados con Etilenglicol (ViGRO™ Ethylene Glycol Freeze Plus with 0.1M Sucrose. Bioniche). Los embriones fueron colocados de manera individual en pajillas de 0.25ml; se colocaron a -6°C durante 5 minutos con la inducción de la cristalización “seeding”, permaneciendo a -6°C por 10 minutos; pasado este tiempo se redujo la temperatura 0.5 ° C por minuto hasta -35°C, una vez alcanzada esta temperatura, se transfirieron directamente al nitrógeno líquido.

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

#### 4.2.4. Descongelación

La descongelación se llevó a cabo por el método de un paso. El cual consiste en extraer las pajillas del termo de nitrógeno manteniendo a temperatura ambiente durante 15 segundos, después se deposita en el baño maría a 30°C por 10 segundos. A continuación se transfiere el contenido de la pajilla sobre una caja de petri para posteriormente transferir el embrión al medio de descongelación (ViGRO™ One Step Thaw Plus BIONICHE) donde permanece por 5 minutos, para después ser colocados en medio holding Plus®, donde se mantuvieron hasta ser fijados para la técnica de TUNEL.

#### 4.2.5. Técnica de TUNEL

Como criterio para definir la calidad embrionaria y realizar la toma de decisión, con respecto a los dos métodos de evaluación; se utilizo la técnica de TUNEL, la cual mide el grado de muerte celular programada (apoptosis), por medio de la contabilización del número de células TUNEL positivas. Para esta evaluación se utilizaron los mismos criterios descritos por (Márquez *et al*; 2005 y Contreras *et al*; 2008) tomando como embriones de

buena calidad, aquellos que tuvieran un número menor de 14 células apoptóticas, en los de regular calidad, se contabilizaron entre 15 y 20 células TUNEL positivas y los embriones de mala calidad se consideraron aquellos con un número mayor a 21 células apoptóticas.

Para este fin, los embriones fueron fijados en paraformaldehído al 4% (Aldrich Chemicals Company Inc., USA) en PBS, pH 7.4 durante 30 minutos, después se lavaron 2 veces en PBS por 5 minutos; a continuación, se colocó la solución de Triton X-100 al 0.1% (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) por 2 minutos y se lavaron 3 veces en PBS, para posteriormente incubarlos durante 1 hora a 37<sup>o</sup> C con 200  $\mu$ l de solución de TUNEL (Fluoresceína-Dutp y dinucleotidil transferasa tdt). De esta manera, es posible detectar la fragmentación de las cadenas de DNA marcando el extremo 3'-OH utilizando un nucleótido marcado (fluoresceína-dUTP), mientras que la enzima tdt realiza la transferencia de los nucleótidos. El conteo de los núcleos apoptóticos, se realizaron con microscopio confocal LSM 5 pascal, Zeiss (Argon-Krypton laser), con filtro BP 450-490.

#### **4.3. Análisis estadístico**

El análisis de las características morfológicas de los embriones de buena, regular y mala calidad, se realizó por estadística descriptiva a través de análisis de frecuencias, para cada método de evaluación en los diferentes estadios de desarrollo (mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido). Para medir la concordancia entre los diferentes métodos, por los cuales fueron evaluados los embriones: microscopía estereoscópica con el microscopía de contraste de fases así como microscopía estereoscópica con TUNEL y microscopía de contraste de fases con TUNEL, para cada estadio de desarrollo: mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido (categorías mutuamente excluyentes) se utilizó la prueba estadística de Kappa de Cohen, para lo cual se empleó al programa Win episcope 2.0. De esta forma se obtuvo el índice de concordancia kappa (k), el cual va determinar hasta que punto la concordancia observada es superior a la esperada obtener por puro azar; sí la concordancia es perfecta, el valor de  $k=1$ ; si la concordancia observada

es igual a la esperada  $k=0$ ; y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado  $k<0$ . La toma de decisión se realizó en base al cuadro 3.

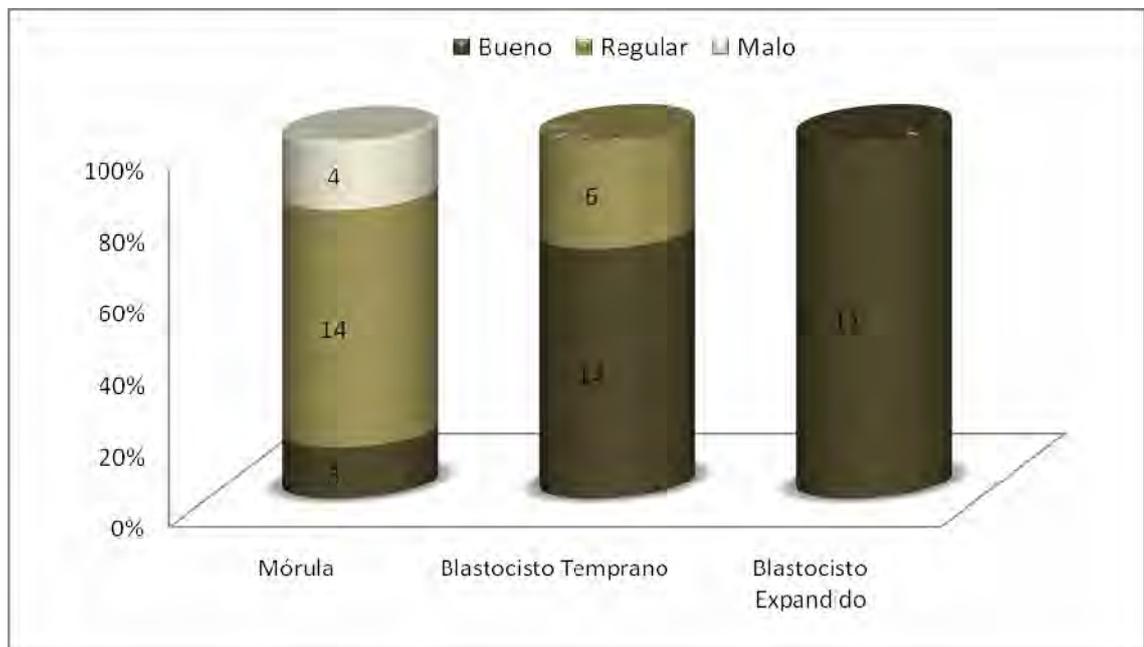
**Cuadro 3.** Nivel de concordancia de acuerdo al índice de kappa ( $k$ )

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

## V. RESULTADOS

### 5.1 Evaluación de los embriones mediante microscopía estereoscópica

Setenta y cuatro embriones fueron evaluados y clasificados por el método de microscopía estereoscópica MEst. Después de la evaluación, en fresco, tanto los ovocitos como los embriones con un estado de desarrollo anterior a la mórula compacta, fueron eliminados del proyecto, por lo que sólo se utilizaron 52 embriones en los estadios de desarrollo de mórula compacta, blastocisto temprano y blastocisto expandido, en las calidades de bueno, regular y malo. Los resultados obtenidos de la evaluación estereoscópica se muestran en la figura 1, dónde vemos que el 14% de las mórulas (n=21) fueron de buena calidad, 67% regular y 19% de mala calidad; en cuanto a los blastocistos tempranos (n=20) el 70% correspondieron a embriones de buena calidad y el 30% de calidad regular y el 100% de los blastocistos expandidos (n=11) fueron de buena calidad.



**Figura 1.** Distribución del grado de calidad embrionaria (bueno, regular y malo) de acuerdo al estadio de desarrollo (mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido) a la evaluación realizada mediante el microscopio estereoscópico

## 5.2 Evaluación de los embriones mediante el microscopio invertido de contraste de fases

Al realizar la evaluación por este sistema, en cuanto a sus características morfológicas se observó que de las mórulas evaluadas (n=21) por el microscopio invertido de contraste de fases MCF el 33% fueron buenas, el 43% regulares y el 24% malas, mientras que el 75% de los blastocistos tempranos (n=20) fueron catalogados como de buena calidad y el 25% de regular, así como 91% de los blastocistos expandidos (n=11) fue de buena calidad y sólo el 9% fue evaluado como regular (Figura 2).



**Figura 2.** Distribución del grado de calidad embrionaria (bueno, regular y malo) de acuerdo al estado de desarrollo (mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido) a la evaluación realizada mediante el microscopio invertido de contraste de fases

### 5.3 Evaluación embrionaria mediante la técnica de TUNEL

Esta evaluación fue utilizada como criterio para definir el grado de calidad del embrión. En la figura 3, se observa que el 67% de las mórulas fueron clasificados como de buena calidad; el 14% como regulares y el 19% como malos; de los blastocistos tempranos fueron clasificados como buenos el 65%, el 30% como regular, sólo el 5% como malos y los blastocistos expandidos el 100% fueron evaluados como embriones de buena calidad.

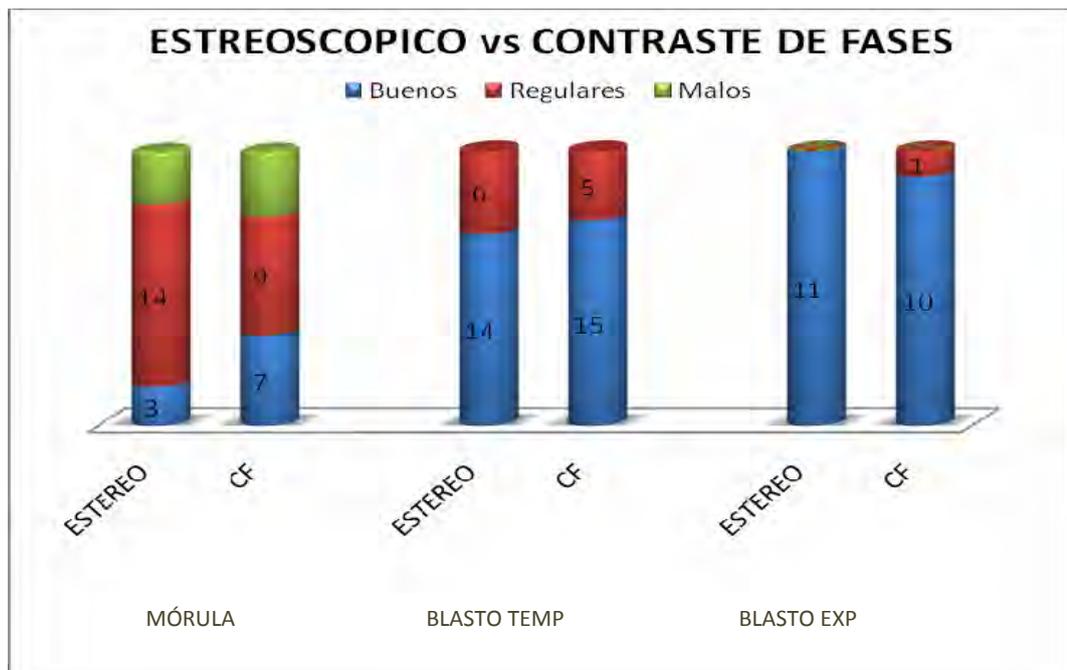


**Figura 3.** Distribución del grado de calidad embrionaria (bueno, regular y malo) de acuerdo al estado de desarrollo (mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido) a la evaluación realizada mediante la técnica de TUNEL

## 5.4 COMPARACIÓN ENTRE EVALUACIONES

### 5.4.1 Estereoscópico – Contraste de fases

Al realizar la comparación entre los dos métodos de evaluación en cuanto a calidad (bueno, regular y malo), del total de embriones clasificados como buenos (n=28) por el MEst, el 93% fueron catalogados como de buena calidad por el MCF. Dentro del estado de desarrollo, las mórulas evaluadas como de buena calidad por ambos métodos concordaron al 100% (n=3), mientras que de los embriones regulares (n=14) el 64% concordaron con los dos métodos de evaluación; el 28.6% (n=4) fueron evaluados como de buena calidad y el 7% (n=1) como de mala calidad por el MCF (figura 4).



**Figura 4.** Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (MEst vs MCF); en cuanto a calidad (buena, regular y mala) de acuerdo al estado de desarrollo (mórula, blastocisto temprano, blastocisto expandido)

#### 5.4.2 Estereoscópico – TUNEL

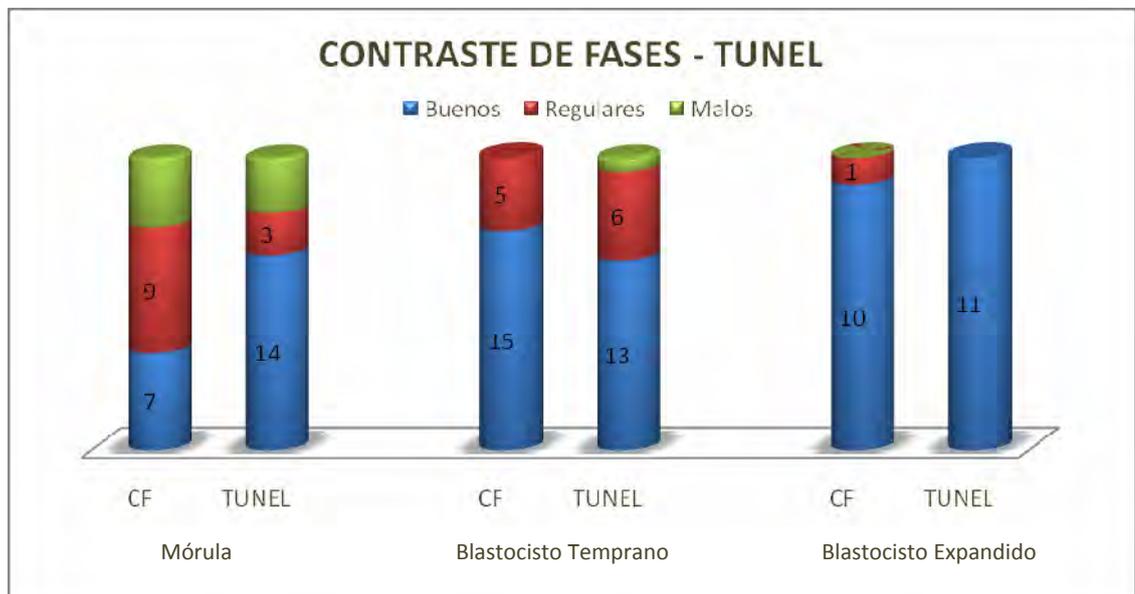
En la figura 5 se muestra la concordancia existente entre el microscopio estereoscópico con la técnica TUNEL, dónde observamos que al igual que con el CF, el 100% de los embriones evaluados como buenos y malos concordaron entre los dos métodos de clasificación, en el estado de mórula, mientras que solo el 21% de los embriones regulares (n=3) coincidieron en ambas evaluaciones, el 79% restantes (n=11) fueron evaluados como embriones de buena calidad. Para los blastocistos tempranos el 100% de los embriones regulares y el 93% de los embriones buenos fueron evaluados de igual forma por ambos métodos, el 7% de los embriones buenos (n=1) fue evaluado como de mala calidad por la técnica de TUNEL. El 100% de los blastocistos expandidos fueron calificados como de buena calidad por los dos métodos.



**Figura 5.** Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (estereoscópico vs TUNEL) en cuanto a calidad (buena, regular y mala) de acuerdo al estado de desarrollo (mórula, blastocisto temprano, blastocisto expandido)

### 5.4.3 Contraste de fases - TUNEL

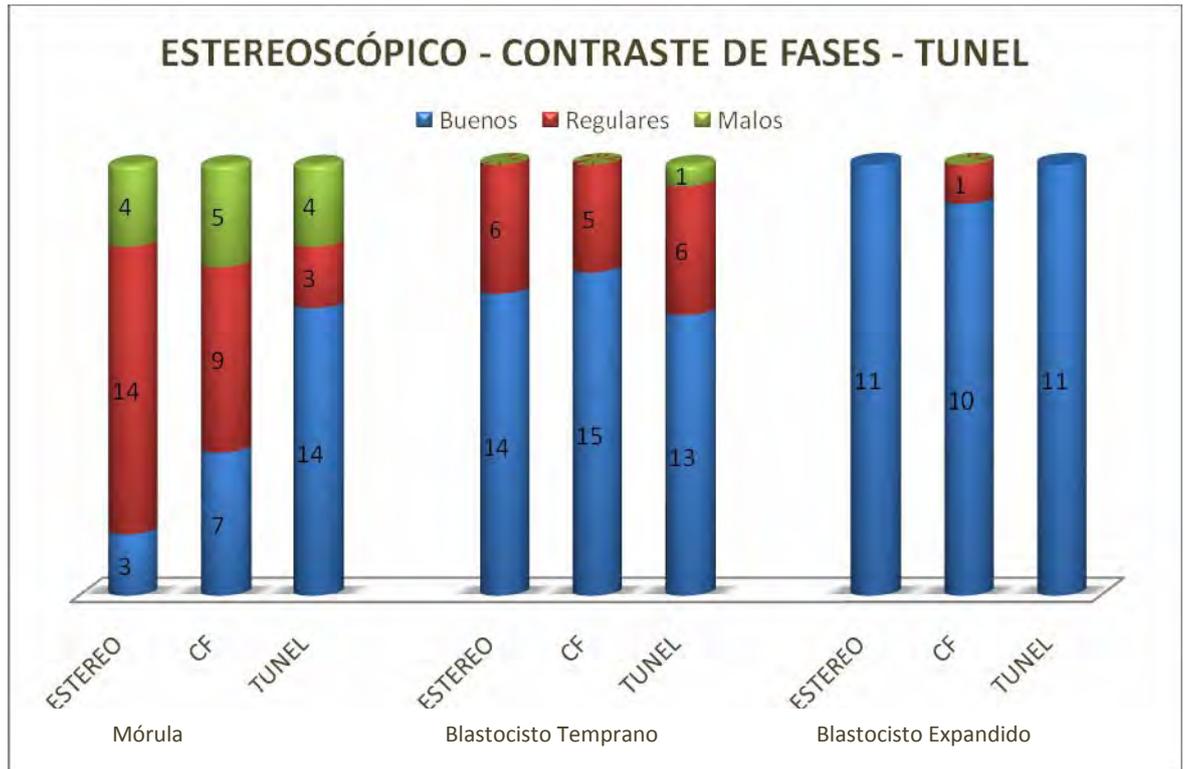
Con respecto al microscopio invertido de contraste de fases, al comparar las evaluaciones con las efectuadas por la técnica de TUNEL, se pudo observar que al igual que con MEst, el 100% de las mórulas fueron evaluadas como buenas por ambos métodos, mientras que sólo el 33% (n=3) de las regulares permanecieron como calidad regular por TUNEL y el 67% (n=6) fueron evaluados como de buena calidad. En cuanto a las mórulas de mala calidad concordaron el 80% (n=4) y el 20% (n=1) fue clasificada como mórula de buena calidad. Con respecto a los blastocistos tempranos el 87% de los embriones buenos, el 83% de los regulares, así como el 91% de los blastocistos expandidos concordaron entre las evaluaciones (Figura 6).



**Figura 6.** Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (contraste de fases (MCF) vs TUNEL) en cuanto a calidad (buena, regular y mala) de acuerdo al estado de desarrollo (mórula, blastocisto temprano, blastocisto expandido)

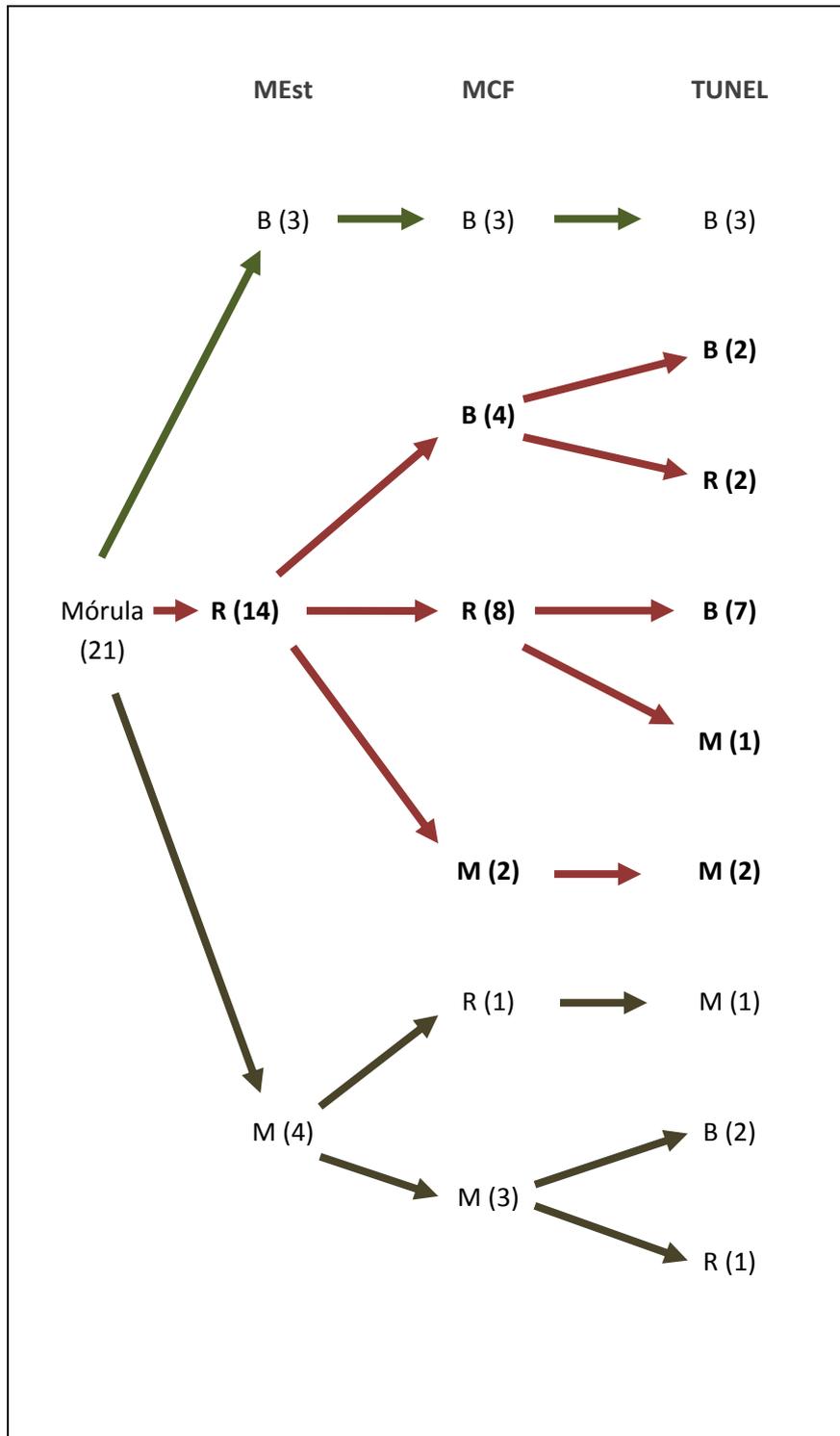
#### 5.4.4 Estereoscópico-contraste de fases-TUNEL

Al realizar la comparación entre los dos métodos de evaluación con la prueba de TUNEL (Figura 7) se observó un incremento en los embriones clasificados como buenos con respecto a los evaluados con el MCF y MEst, disminuyendo el número de embriones clasificados como de calidad regular.

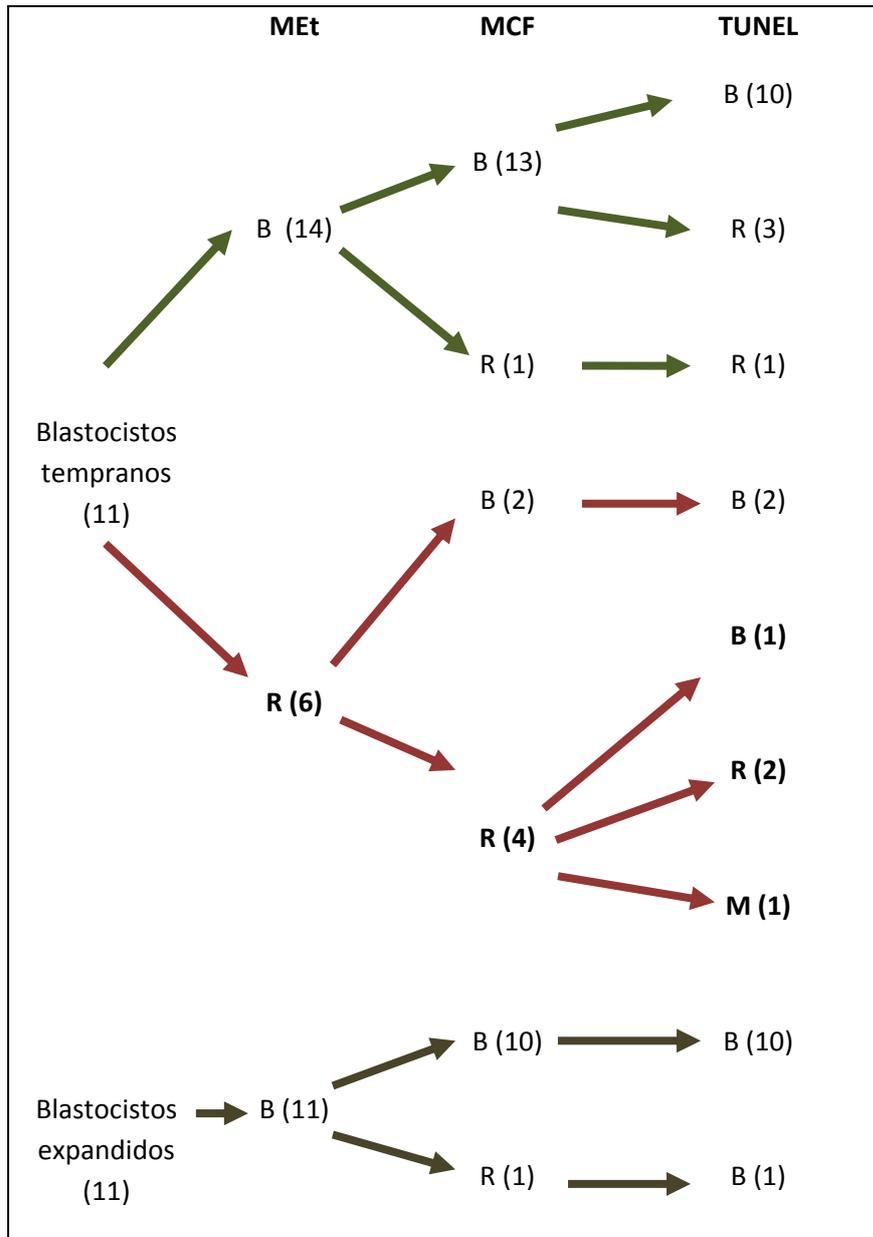


**Figura 7.** Valores absolutos de los embriones observados a la comparación de los métodos de evaluación (estereoscópico (ESTEREO), contraste de fases (CF) y TUNEL) en cuanto a calidad (buena, regular y mala) de acuerdo al estado de desarrollo (mórula, blastocisto temprano, blastocisto expandido)

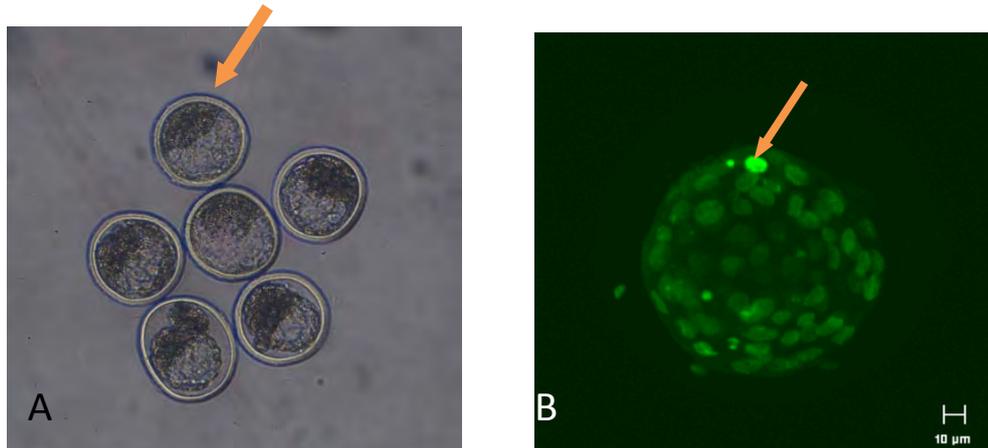
Al comparar los tres métodos de evaluación (MEst, MCF y TUNEL) del total de embriones evaluados, se mostró que al igual que con los métodos ópticos de valoración, no hay diferencias importantes con los embriones evaluados como de buena o mala calidad, no siendo así para los regulares, específicamente en el estado de mórula, donde 9 de las 14 mórulas calificadas por MEst, y 7 de las 8 mórulas evaluadas como regulares por el MCF, fueron designadas como de buena calidad por la técnica de TUNEL. Así tenemos que la concordancia entre los métodos morfológicos de evaluación (MEst y MCF) con la prueba de TUNEL es pobre (Figura 8 a y b)



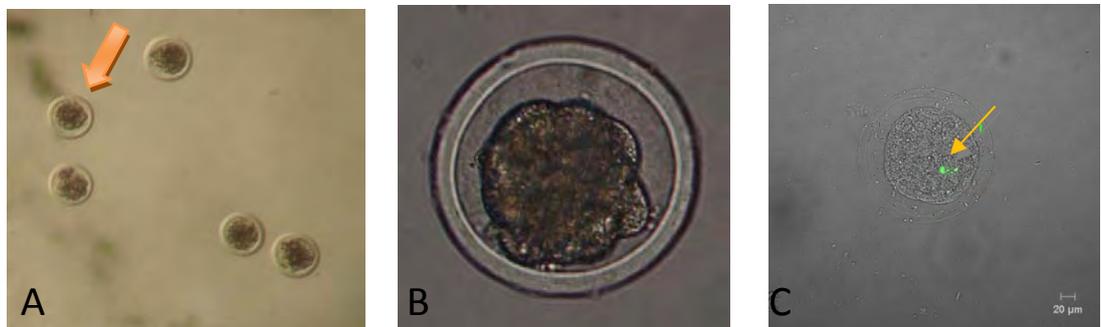
**Figura 8a.** Cambios ocurridos según el método de evaluación utilizado en la clasificación de las mórulas. El grado de calidad se representa por la letra (B) bueno, (R) regular y (M) malo y el número de embriones evaluados para cada grado de calidad está entre paréntesis.



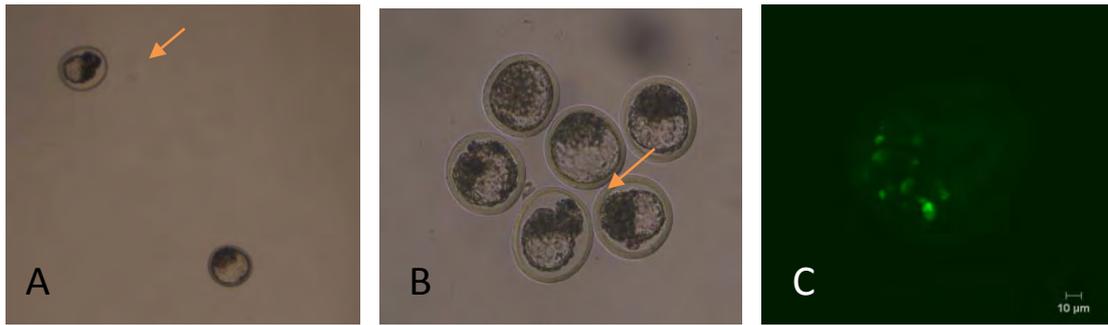
**Figura 8b.** Forma en que ocurrieron los cambios por método de evaluación utilizado en la clasificación de los blastocistos tempranos y expandidos. El grado de calidad se representa por la letra (B) bueno, (R) regular y (M) malo y el número de embriones evaluados para cada grado de calidad está entre paréntesis.



**Figura 9.** Embrión de buena calidad evaluado por microscopia de contraste de fases (A) señalado por la flecha y (B) el mismo embrión procesado por la técnica de TUNEL, la flecha marca una célula TUNEL positiva



**Figura 10.** Mórula evaluada como de buena calidad mediante los tres diferentes métodos: (A) microscopio estereoscópico, señalada por la flecha, (B) contraste de fase y (C) TUNEL, la flecha indica la presencia de una célula TUNEL- positiva



**Figura 11.** (A) Blastocisto evaluado como calidad regular mediante el estereoscópico, (B) al ser clasificado por el contraste de fases se valoro como bueno y al realizar la técnica de TUNEL (C), se corroboró que efectivamente era de buena calidad. Las flechas señalan el embrión correspondiente en A y B

### **5.5 CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN**

Para la determinación de concordancia entre los métodos de evaluación (MEst vs MCF; MEst vs TUNEL y MCF vs TUNEL) se hizo el análisis estadístico de Kappa de Cohen, donde la concordancia fue establecida de acuerdo al cuadro 2. En cuanto al grado de calidad, se mostró una buena concordancia ( $k=0.61$ ) entre los dos primeros métodos (MEst vs MCF), no siendo así para los métodos de evaluación meramente morfológicos MEst y MCF con TUNEL ( $k=0.17$  y  $k=0.22$ ) respectivamente.

Así también, es importante destacar la tendencia para la evaluación respecto al estadio de desarrollo, dónde observamos que sin importar la concordancia entre los distintos métodos de evaluación el índice kappa (concordancia) se va incrementando conforma avanza el estadio de desarrollo del embrión (cuadro 4).



**Cuadro 4.** Índice de concordancia kappa: a) Insignificante, b) pobre, c) moderado, d) bueno, e) muy bueno, entre métodos de evaluación (Estereoscópico MEst; Contraste de fases MCF y TUNEL) para cada estadio de desarrollo.

		MEst			MCF			TUNEL		
		Mórula	Blastocisto temprano	Blastocisto	Mórula	Blastocisto temprano	Blastocisto	Mórula	Blastocisto temprano	Blastocisto
MEst	Mórula	1.0	1.0	1.0	0.46 <sup>c</sup>			0.08 <sup>a</sup>		
	Blastocisto temprano	1.0	1.0	1.0		0.62 <sup>d</sup>			0.12 <sup>a</sup>	
	Blastocisto	1.0	1.0	1.0			0.90 <sup>e</sup>			1 <sup>e</sup>
MCF	Mórula	0.46 <sup>c</sup>			1.0	1.0	1.0	0.007 <sup>a</sup>		
	Blastocisto temprano		0.62 <sup>d</sup>		1.0	1.0	1.0		0.43 <sup>c</sup>	
	Blastocisto			0.90 <sup>e</sup>	1.0	1.0	1.0			0.90 <sup>e</sup>
TUNEL	Mórula	0.08 <sup>a</sup>			0.007 <sup>a</sup>			1.0	1.0	1.0
	Blastocisto temprano		0.12 <sup>a</sup>			0.43 <sup>c</sup>		1.0	1.0	1.0
	Blastocisto			1 <sup>e</sup>			0.90 <sup>e</sup>	1.0	1.0	1.0

## VI.DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación, fue realizar una comparación mediante el MEst y el MCF, en embriones de ganado *Bos indicus*, en el cual el tipo de valoración de los mismos, en los estados de mórula y blastocisto, fue establecido originalmente en forma morfológica de acuerdo a las características ópticas, no invasivas, de las particularidades de tamaño, forma, simetría, color y apariencia de las células embrionarias (Linder and Wright, 1983). Actualmente, sabemos que la evaluación embrionaria basada exclusivamente en la observación morfológica de las estructuras, es imperfecta, sin embargo, al igual que en humanos, sigue siendo el método preferido para la selección de embriones previo a la transferencia, en los programas de reproducción asistida (Alikani *et al.*, 2002).

En el presente estudio, los criterios de evaluación de la calidad de los embriones, utilizados tanto para la valoración MEst como para la MCF; coinciden con los utilizados por Shea (1981), Márquez *et al.*, (2004), Contreras *et al.*, (2008). Estos autores encontraron que embriones evaluados por MEst de buena calidad presentan una forma esférica, color ámbar y sin alteraciones de la zona pelúcida, los regulares presentan algunas imperfecciones en la zona pelúcida, además de detritus celulares y algunos blastómeros con forma irregular, en tanto que los malos poseen mayor cantidad de desechos celulares y un número más alto de blastómeros irregulares, extruídos y en degeneración. Por medio del presente estudio, se pudo constatar que dichos criterios pueden ser observados tanto por el MEst como por MCF, sin embargo, ciertos daños de la zona pelúcida, de la integridad y unión de los blastómeros no pueden ser bien identificadas por el método estereoscópico. Albiñ *et al.*, (1990), determinaron que en los blastocistos de buena calidad hay una clara diferenciación entre las células trofoblásticas, células de la masa celular interna y formación del blastocele. Al respecto, Linares y King, (1980) concuerda con las características de evaluación antes mencionadas. Sin embargo, mencionan que en la evaluación realizada por el microscopio invertido de contraste de fases, se observaron ciertas especificidades que no pueden ser vistas tan claramente con el MEst, como son el complejo de uniones entre las células del trofoblasto. De acuerdo a

los resultados obtenidos en el presente estudio las discrepancias observadas entre embriones de diferente calidad fueron visibles por los dos métodos de evaluación utilizados.

En cuanto al grado de calidad, se mostró una buena concordancia entre métodos, de acuerdo al estadístico de Kappa de Cohen (80%,  $k=0.61$ ). Teniendo que para el MEst se tuvieron 54% de embriones de buena calidad comparado con el 62%, evaluado por el MCF, 38 vs 30% de calidad regular y 8 vs 10% de mala calidad. Es importante destacar que a la evaluación estereoscópica del total de las mórulas, el 67% se valoraron como calidad regular, mientras que los embriones en etapas más avanzadas de desarrollo, blastocistos tempranos y expandidos, el mayor porcentaje se clasificó como buenos, siendo 70 y 100% respectivamente. Esta misma tendencia se encontró en la evaluación realizada por el método MCF, teniendo el 43% de mórulas calidad regular aunque en menor proporción que por MEst, observando que para el estado de mórula, la concordancia entre métodos deja de ser buena para ser moderada ( $k=0.46$ ), no siendo sí para los blastocistos. Para los blastocistos el mayor porcentaje se evaluó como de buena calidad y su concordancia sigue siendo buena y muy buena en el caso de los blastocistos expandidos. Al igual que Callesen *et al.*, (1995), pudimos observar que los embriones, que presentan un estado de desarrollo más avanzado, en promedio tienen un mejor grado de calidad (91% blastocistos expandidos de buena calidad) que las etapas más tempranas (blastocistos tempranos 75 y mórulas 33%). Al respecto, Antunes *et al.*, (2008) mencionan que en embriones producidos *in vitro*, de nueve células hasta los estados de mórula presentan un menor grado de calidad, cuando son comparados con los blastocistos, al ser evaluado su índice de apoptosis.

Lo anterior contrasta con la evaluación realizada por la técnica de TUNEL sobre los mismos embriones, en la cual el mayor porcentaje de las mórulas fueron evaluadas como de buena calidad (67%) y las regulares disminuyeron al 14% lo que nos indica una baja concordancia de acuerdo al análisis estadístico de Kappa, entre la técnica de TUNEL con el MEst ( $k= 0.169$ ), y pobre con el contraste de fases ( $k= 0.217$ ). De acuerdo a estos resultados, no podemos tener una certeza de la calidad de los embriones al ser evaluados

únicamente por su forma morfológica. Así, Rondeau *et al.*, (1995), también reportaron que al evaluar el metabolismo de embriones, el 47% de los clasificados como de buena calidad, por método tradicional estereoscópico, no tenían actividad metabólica normal, debido quizá a defectos funcionales que no pueden ser detectados cuando se utiliza un método subjetivo como es la evaluación microscópica.

Esta discordancia en las evaluaciones se ha mencionado en otros trabajos. Aguilar *et al.*, (2002) demostraron que existe hasta un 30% de variabilidad en los criterios de valoración; en el presente estudio se encontró que la mayor discrepancia se presenta en los embriones en estado de mórula clasificados como de regular calidad. Lo anterior concuerda con lo mencionado por López-Demian *et al.*, (2008), quienes observaron que en embriones de vacas *Bos taurus* la mayor incertidumbre se presentaba en los de calidad regular. Sin embargo, concluyen que en los embriones de *Bos indicus* es inexacta la evaluación de los embriones de buena calidad en un 25% mientras que para los embriones de *Bos taurus* es adecuada. En el presente estudio se encontró una variabilidad menor al 10% en los embriones de buena calidad. Estas diferencias en cuanto a variabilidad en las clasificaciones, se puede deber tanto al método de evaluación como a las diferencias entre evaluadores. Farin *et al.*, (1995); señalaron que la constancia entre evaluadores para la correcta clasificación del grado de calidad es aproximadamente del 60% en embriones producidos in vivo. Lo anterior sugiere que los embriones producidos de forma rutinaria tienen cierto grado de error en cuanto a su evaluación, quedando claro que efectivamente en la actualidad se carece de algún método para evaluar y clasificar los embriones de manera precisa, objetiva y no invasiva para conocer la viabilidad de los mismos. Al respecto, Walker (1989) menciona que la calidad del embrión expresa la viabilidad de éste, ya que la reducción de la misma en términos de pobre calidad se refleja en una tasa de desarrollo más lenta. En este sentido, Callesen *et al.*, (1995) señalan que la relación entre el estado de desarrollo y el grado de calidad, se ve limitado al método de evaluación, el cual en la mayoría de los casos, resulta ser muy simple. Es decir, existe mayor dificultad el asignar el grado de calidad al evaluar estados de desarrollo más tempranos (mórulas, blastocistos tempranos) que estados más avanzados (blastocistos expandidos), tomando en cuenta que la variación existente puede deberse a la

imprecisión en la definición de los grados de calidad y la consideración de cada evaluador sobre los defectos específicos (Farin 1995). No obstante, se concuerda con que existe una menor variabilidad en las evaluaciones realizadas para el estado de desarrollo que para los grados de calidad, siendo mejor la concordancia para los grados extremos (bueno y malo) que para los regulares (Farin et al., 1995). En cuanto al grado de desarrollo, Betteridge and Rieger (1993) observaron que las anormalidades y las células en degeneración son más difíciles de identificar en los blastocistos que en las mórulas.

A diferencia de este trabajo, Aguilar *et al* (2002), observaron una disminución del 51 al 26% en los embriones de buena calidad al ser evaluados por MEst y microscopia de luz respectivamente, mientras que los regulares se incrementaron del 24 al 32%, mientras que en el presente estudio, los embriones de buena calidad se fueron incrementando cuanto más preciso era el método de evaluación, sobre todo, en el estado de mórula, 14% de embriones buenos evaluados por el MEst, y 33% por el MCF aumento hasta el 67% cuando la evaluación se realizó por medio de la técnica de TUNEL. Esto concuerda con lo obtenido por López-Demian *et al* (2008), quienes utilizaron la microscopia electrónica de transmisión para evaluar la calidad de los embriones y mostraron que el porcentaje de embriones buenos aumento (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 el mismo porcentaje. En este trabajo se observó que un 60% de los embriones evaluados como regulares por MEst y MCF fueron valorados como de buena calidad al ser sometidos a la prueba de TUNEL, al igual, en un estudio paralelo en vía de publicarse (Godínez, 2009) donde el 60% de los embriones evaluados como de calidad regular, sin tomar en cuenta el estado de desarrollo, fueron catalogados como de buena calidad al ser sometidos a métodos de evaluación más precisos (medio de cultivo, grado de apoptosis por la técnica de TUNEL y grado de proliferación celular por la técnica de BrdU).

Esta característica en la evaluación de los embriones clasificados como regulares ha sido observada por diferentes autores (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 regular. Así también, López-Demian *et al.*, (2008) observaron que el mayor porcentaje de error se encontraba en los embriones regulares; sin embargo, en este trabajo los embriones regulares tendían a evaluarse como de menor calidad (malos), mientras que en el presente trabajo fue lo contrario, los embriones regulares, al ser sometidos a la técnica de TUNEL, la mayoría se determinó que eran de buena calidad. Esto podría deberse a que en los embriones evaluados por microscopía estereoscópica se utilizaron criterios de inclusión menos estrictos, por consiguiente, al ser evaluados por un método más preciso como la microscopía electrónica, tendieron a bajar su grado de calidad. Un ejemplo de esto se presenta en los evaluadores que trabajan regularmente con ganado de tipo *Bos indicus*, dónde en los programas de producción de embriones, se ha observado una menor producción de estos haciendo que la valoración tienda a ser menos estricta, al ser comparada con la utilizada con los embriones de tipo europeo. Aunado a lo anterior, Farin *et al.*, (1999) mencionan que la importancia de realizar una evaluación más o menos certera, radica en la tasa de gestación, ya que las diferencias entre evaluaciones pueden dar una diferencia del 16% en las gestaciones.

En cuanto a la evaluación realizada por medio de la técnica de TUNEL, se encontraron células Tunel-positivas en todos los embriones. Estos resultados concuerdan con los reportados por Gjørret *et al.*, (2003), Márquez *et al.*, (2004), Contreras *et al.*, (2008), dónde que detectaron células Tunel-positivas en los embriones evaluados aún en diferentes etapas de desarrollo. Trabajos anteriores han mostrado que pueden encontrarse embriones que al parecer son de buena calidad morfológica al ser evaluados por el método rutinario MEst, pero no siempre tienen una actividad metabólica normal, pudiendo tener defectos funcionales que no son detectados al ser evaluados en fresco y que por ende al ser sometidos al proceso de congelación, pueden no ser viables al momento de ser transferidos (Aguilar *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2004). Esto puede ser un serio problema en los programas masivos de producción de embriones, en especial, en países como México, donde los programas tienden a masificarse debido a subsidios gubernamentales y decisiones políticas que posiblemente contribuyen a que los controles de calidad y criterios de selección puedan ser menos estrictos. Así mismo, por la cantidad

de embriones producidos es posible que las condiciones de almacenamiento no sean las óptimas. En efecto, un estudio realizado por Márquez *et al.*, (2004) demuestra que los embriones que han sido evaluados y clasificados como de buena calidad al microscopio estereoscópico por personal calificado y almacenados por diferentes periodos de tiempo en nitrógeno líquido, presentan daño celular al evaluarlos por otros métodos, como la técnica de TUNEL.

Dentro de los métodos más frecuentemente utilizados para la detección de apoptosis en los embriones en etapas tempranas, encuentran los que se basan en la observación morfológica de procesos típicos de la apoptosis como es la condensación y fragmentación nuclear (Microscopía electrónica y marcación morfológica con fluorescencia), o en la evaluación de la presencia específica de la degradación del DNA (Prueba de TUNEL) (Betts *et al.*, 2001). En el presente estudio, empleando la prueba de TUNEL se observó que embriones clasificados como buenos presentaron un menor número de células Tunel-positivas que los regulares y los malos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Márquez *et al.*, (2004) y Contreras *et al.*, (2008). Sin embargo, pudimos observar que de los embriones evaluados morfológicamente como regulares, el 60% presentaban un número de células Tunel-positivas, similar a los embriones clasificados como de buena calidad, lo que nos lleva a sugerir que independientemente de la morfología presente en los embriones al momento de ser evaluados en fresco o después de la congelación, lo que va delimitar su calidad y viabilidad es su función metabólica. Se han realizado estudios en base a la fragmentación de los embriones, ya que es uno de los criterios más significativos empleados para describir el estado de los mismos en base a su morfología, y es tomado en cuenta como índice de calidad. Hardy y Spanos, (2002) mencionan que la fragmentación citoplasmática puede ser un marcador no invasivo de la muerte celular programada tipo apoptosis, especialmente en la masa celular interna (MCI). Al respecto, Antunes *et al.*, (2008) menciona que el índice de apoptosis como parámetro para medir la calidad embrionaria es superior a la fragmentación. Sin embargo, en humanos se ha observado que la relación entre la fragmentación y la apoptosis es subjetiva (Van Blerkom, 1999; Hardy, 1999, Jursicova *et al.*, 2003). Ikeda *et al.*, (2006) mencionan que existe la posibilidad de que la fragmentación embrionaria se deba más a la asimetría en la

división celular, que al proceso de apoptosis. En otro estudio se mostró que el índice de células apoptóticas fue el mismo en mórulas que presentaban un 50% más de fragmentación, indicando que la apoptosis y la fragmentación pueden ocurrir como procesos independientes (Van Soom *et al.*, 2003). Estos estudios nos llevan a sugerir que uno de los errores que se ejecutan al momento de la evaluación morfológica, como lo muestra este trabajo, puede recaer en el porcentaje de fragmentación, sobre todo en los estados de mórula, los cuales se podría estar penalizando el grado de calidad, y de este modo, embriones que morfológicamente aparentan tener menor calidad (regular o malo), están siendo evaluados erróneamente.

De acuerdo a lo antes mencionado, y a los resultados de este trabajo podemos afirmar que la apoptosis esta muy relacionada con la calidad del embrión. A este respecto, Byrne *et al.*, (1999); Contreras *et al.*, (2008) y Godínez, (2009) demostraron que los blastocistos con mayor incidencia de células con características de apoptosis, poseen menor potencial de desarrollo al ser cultivados, demostrando que cuando el porcentaje de muerte celular llega a un nivel crítico es dañino para el desarrollo del embrión a pesar de ser este un mecanismo fisiológico.

Por otro lado, existen nuevas técnicas que nos pueden ayudar a predecir la calidad embrionaria. Un parámetro no muy estudiado y que puede ser de ayuda para medir la calidad embrionaria es la presencia del índice de proliferación celular, el cual puede ser evaluado por la presencia de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que es un marcador específico de la fase S del ciclo celular y es un componente esencial de la maquinaria de reparación y replicación del DNA (Makarevich *et al.*, 2002). Otro método empleado es la incorporación de 5'bromo2'deoxy-uridine (BrdU) utilizada para monitorear la síntesis de DNA (en la fase S) y la proliferación celular por inmunocitoquímica (Moussa *et al.*, 2005). Así, Godínez (2009) realizó una comparación entre el número de células TUNEL positivas y la proliferación celular por medio de la técnica de incorporación de BrdU en embriones bovinos, mantenidos en cultivo. De esta manera se observó que no existen diferencias significativas entre el número de células Tunel-positivas entre embriones frescos y congelados pero si en el número de células

BrdU positivas, siendo mayor esta diferencia en los embriones regulares y malos. Por ende un método no invasivo y que no requiera de equipo costoso, pero que cuente con la precisión del BrdU podría ser una alternativa para mejorar la eficacia de la evaluación de embriones previo a la transferencia.

## VII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este estudio, es recomendable que los programas de transferencia de embriones, que se realicen en el trópico con vacas cebuinas, se aboquen a la mejor época del año (lluvias), lo que podría resultar en el aumento del porcentaje de éxito durante la evaluación de los embriones y por consiguiente en su posterior transferencia o congelación.

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las evaluaciones realizadas mediante el MEst y el MCF, si se observó una diferencia numérica entre ambos métodos, siendo esta más marcada, en la valoración realizada en el estadio de mórula de calidad regular, observándose un incremento de los embriones de buena calidad al realizarse la evaluación por MCF.

Entre lo referente a las evaluaciones realizadas por los métodos morfológicos (MEst y MCF) y la técnica de TUNEL, si se pudieron observar diferencias significativas, para los estadios de mórula y blastocisto temprano, lo que nos indica que entre más avanzado sea el estado de desarrollo del embrión, la evaluación morfológica tiende a ser más precisa sin importar el método de evaluación empleado.

Sobre la base de estos antecedentes, se sugiere realizar más investigaciones al respecto, con la finalidad de encontrar un método que vaya más allá de los parámetros de calidad en cuanto los cuales resultan ser subjetivos, pero que no comprometa la viabilidad de los embriones y de ser posible, aplicable a nivel de campo.

## VIII. LITERATURA CITADA

**Abe H.**, Otoi T., Tachikawa S., Yamashita S, Satoh T, Hoshi. H. Fine structure of bovine morula and blastocyst in vivo and in vitro. *Anat Embryol.* 1999, 199:519-527

**Abe H.**, Matsuzaki S and Hoshi H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology* 2000, 57: 1273-1283.

**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, 61: 57-66. 2002

**Aguilar MM.**, Galina CS., Merchant H. Comparison of stereoscopy, Light microscopy and ultraestructural methods for evaluationof bovine embryos. *Reprod Dom Anim.* 2002, 37: 341-346

**Alikani M.** Sadowy S., Cohen J. Human embryo morphology and developmental capacity. In: Van Soom, Boerjan ML. (eds). *Assesment of Mammalian Embryo Quality.* Kluwer's Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp. 267-293

**Albihn A,** Rodriguez-Martinez H, Gustafsson H. Morphology of day 7 bovine demi-embryo during in vitro reorganization. *Acta Anatomical,* 1990, 138: 42-49

**Antunes G.,** CheveiroP., Marques A., Jin HS., Moreira da Silva F. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod Dom Anim,* 2008, (DOI) 10.1111/j.1439-0531.2008.01131

**Barlow P.,** Owen D., Graham C. DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. *J Embryol. Exp. Morphol.* 1972, 27: 432-445

**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

- Bettridge KJ.** Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriology*. 1995, 44: 1061:1098
- Betts DH.** and King WA. Genetic Regulation of embryo death and senescence. *Theriology* 2001, 55: 171-191
- Borland R.** Transport processes in the mammalian blastocyst. *Dev. Mamals*. 1977, 1: 31-67
- Bröker LE.,** Frank AE., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res*. 2005, 11: 3155-3161
- Byrne AT.,** Southgate J., Brison DR., Lesse HJ. Analysis of apoptosis in preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J. Reprod. Fertil*. 1999, 117:97-105
- 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
- Chartrain I and Picard L.** Ultrastructural analysis of bovine embryos at days 6 to 8: correlation with embryo quality. *Theriology*. 1988, 1: 236.
- Christensen LG.** Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriology*. 1991, 3;1:141-149
- Cuello C.,** Berthelot F., Martinat-Botté F., Guillouet P., Furstoss V., Boisseau C. , Manceau P., Locatelli A., 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, 1: 208. Abstract 173.
- 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.
- De Leeuw AM.** Evaluation of uniformity among persons in embryo grading from video recordings. *Theriology*. 1996, 45: 230.

- Dinnyes A.**, Lonergan P., Fair T., Boland MP., Yang X. Timing of first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocyst. *Mol Reprod Dev.* 1999, 53:318-324
- Dobrinsky JR.** Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology.* 2002, 57: 285-302
- Dobrinsky JR.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 1996, 45:17-26
- Donaldson LE.** Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology.* 1984, 21; 6: 1013-1018
- Donnay I.**, Van Langendonck A., Auquier P., Grisart B., Vansteenburugge A., Massip A., Dessy F. Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryo. *Theriogenology.* 1997, 47:1549-1561
- Dorland M.**, Boer-Brouwer H and Otter T. Vesicles as a marker for bovine embryo quality. *Theriogenology.* 1990, 33; 1: 216.
- Edmonson AJ**, Lean IJ, Weaver LD, Farver T Webster G. A body condition scoring chart for Holstein Dairy cows. *J Dairy Sci.* 1989, 72:68-78
- Fabian D.**, Koppel J., Maddox-Hyttel. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 2005; 64:221-231
- Farin P**, Britt J, Shaw D, Sleining B. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 1995, 44:339-350
- Farin PW.** Slenning BD Britt JH. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in Vitro. *Theriogenology* 1999, 52: 659-670
- Fléchon J** and Renard J. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine Blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fert*, 1978, 53:9-12

**Fleming T.**, Sheth B., Fesenko I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophoectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front. Biosci.* 2001. 6:1000-1007

**Gardner D** and Leese H. Assessment of embryo viability prior to transfer by the non-invasive measurement of glucose uptake. *J Experiment Zoo*, 1987, 18: 97-105

**Gavrieli Y.**, Sherman Y., Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Bio.* 1992, 119: 501 Abstract

**Gillbert SF.** *Biología del desarrollo.* 7ª ed Panamericana. 2005 pp. 394

**Ginger E.**, Chaoyu T., Abigail S., McElhinny, Warner CM. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 1999, 61:231-239

**Gjørret JO.**, Hiemke M., Kniji, Steph J., Dieleman, Birthe A., Larsson L., Maddox-Hyttel. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod.* 2003, 69:1193-1200

**Goto Y.**, Noda Y., Mori T., Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured in vitro. *Free Radical Biol Med.* 1993, 15:69-75

**Godinez B.** Evaluación de la viabilidad de embriones F1 frescos y congelados utilizando el cultivo embrionario. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2009

**Greve T and Callesen H.** Embryo technology: implications for fertility in cattle. *Rev Sci Tech off Int Epiz* 2005, 1: 405-412.

**Hardy K.** and Spanos S. Apoptosis in mammalian embryos. In: Van Soom, Boerjan ML. (eds). *Assessment of Mammalian Embryo Quality.* Kluwer's Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 2002 pp 267-293

**Hardy K.**, Handyside AH y Winston RML. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development*. 1999, 107: 597-604

**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.

**Hasler JF.**, Henderson WB., Hurtgen PJ., Jin QZ., Mc Cauley AD., et al., Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 1995, 43: 141-152

**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: 2857-287

**Hasler JF.** The Holstein cow in embryo transfer to day as compared to 20 years ago. *Theriogenology*. 2006, 65: 4-16

**Hasler JF**, McCauley AD., Schermerhorn EC and Foote RH. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*. 1983, 19; 1: 83-99

**Hill BR.**, Kuehner LF. Bovine donor blood cholesterol, embryo color and embryo freezability. *Theriogenology*. 1998, 49: 168

**Ikeda S.**, Prendes JM., Alonso-Montes C., Rodriguez A., Díez C., Kitagawa M., Imai H., Gómez E. Apoptosis independent poor morphology of bovine embryos produced by multiple ovulation. *Reprod Dom Anim*. 2006, 41: 383-385

**Juriscova A.**, Latham KE., Casper RF., Varmuza SL. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod*. 1998, 4: 139-145

**Juriscicova A.,** Antenos S., Vermuzza S. Expression of apoptosis related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod.* 2003, 9:113-141

**Jaattela M.** Multiple cell death pathways as regulators of tumor initiation and progression. *Oncog* 2004;23:2746-2756

**Jordán J.** Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica* 2003, 22:100-106

**Jun JH,** Lee HJ, Song SJ. 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, 1: 204

**Kuzan FB.** Classification of embryos prior to freezing. In: Elsdén RP and GE Seidel. Procedures for recovery, bisection, freezing and transfer eeg bovine embryos. *Animal reproduction and biotechnology laboratory Bulletin.* 1988, 2: 34-45.

**Leist M.,** Jaattela M. Fourth deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviws. Mol. Cell Biol.* 2001, 2: 1-10

**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, 48: 76- 78.

**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.

**Linares T and King WA.** Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Theriogenology.* 1980, 14:123-133

**Lindner GM and Wright RW.** Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 1983, 29: 407-416.

**Lindsell CE.,** Murphy B., Mapletoft R. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology,* 1986, 26: 209-219

- Long CR.,** Dobrinsky JR., Garrett WM., Johnson LA. Dual labeling of the cytoskeleton and DNA strand breaks in porcine embryos produced in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1998, 51: 59-65
- Lopes AS.,** Ramsing N., Larsen LH., Rätty M., Peippo J., Greve T., Callesen H. 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
- López-Damián E.P.,** Galina C.S., Merchant H., Cedillo-Peláez C., Aspron M. Assessment of *Bos taurus* embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy. *J Cell Anim. Biol.* 2008, 2: 72-78
- López JRA.,** Gamboa MEA., and Holy L. Respuesta superovulatoria en Ganado Bos indicus y Bos Taurus bajo condiciones tropicales y efecto del desarrollo y calidad del embrion sobre el porcentaje de gestación. *Vet Mex.* 1995, 26; 3: 189-193
- Maddox-Hyttel P.** and Boerjan M. Electron microscopy of pre-hatching mammalian embryos. In: Van Soom, Boerjan ML. (eds). *Assesment of Mammalian Embryo Quality.* Kluwer's Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 2002 pp 295-296
- Makarevich AV.,** Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potencial of bovine embryos simulated with insulin-like Growth Factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod* 2002;66:386-392
- Marquez YC.,** Galina CS., Moreno N., Ruiz H. and Merchant H. Seasonal effect on cebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 2005, 40: 553-558
- Márquez-Alvarado YC.,** Galina CS., Castilla B., León H., Moreno-Mendoza N. Evidence of Damage in Cryopreserved and Fresh Bovine Embryos Using the Tunel Technique. *Reprod Dom Anim,* 2004, 39:141-145
- Mastromonaco GF,** Semple E, Robert C, Rho GJ, Betts DH, King WA. Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reprod Dom Anim,* 2004, 39: 462-467

**Massip A.**, Mulnard J., Huygens R., Hanzen C., Van Der Zwalmen P., Ectors F., Ultrastructure of the cow blastocyst. *J Submicrosc Cytol* 1981, 13; 1: 31-40

**Matwee C.**, Betts DH and King WA. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*. 2000, 8: 57-68.

**Merton JS.** Morphological evaluation of embryos in domestic species. In: Van Soom, Boerjan ML. (eds). *Assesment of Mammalian Embryo Quality*. Kluwer's Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp. 33-55

**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

**Mohr LR and Trounson AO.** Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod* 1981, 25: 1009-1025.

**Mohr LR and Trounson AO.** Comparative ultrastructure of hatched human, Mouse and bovine blastocyst. *J Reprod Fert.* 1982, 66: 499-504.

**Moussa M.**, Perreau C., Baril G., Duhamp G., Vidament M., Dales P., Bruyas JF., Mermillod P. Comparison of cell proliferation index in equine and caprine embryos using a modified BrdU.incorporation assay. *Theriogenology* 2005; 64:1823-1832

**Neto CA.**, Sanches BV., Perri SHV., Seneda MM and Garcia JF. Improvement in embryo recovery using uterine doublé flushing. *Reprod Fertil Dev* 2004, 16; 1: 207. Abstract 171

**Nogueira MFG.**, Barros BJP., Teixeira AB., Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superestimulated beef cow. *Theriogenology* 2002, 57: 1625-1634

**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.

**Palma GA.** Evaluación morfológica de los embriones bovinos. En: Biotecnología de la reproducción. 2008 pp.237-249

**Pereira DC,** Dode MAN, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 2005, 63:1131-1141

**Occhio M,** Jillella D, Lindsey B. Factors that influence the recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure follicles to LH. *Theriogenology*. 1999, 51:9-35

**Overström EW.** In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology*. 1996. 45: 3-16.

**Rizos D.,** Fair T., Papadopoulos S., Boland P., Lonergan P. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 2002, 62: 320-327.

**Robertson I and Nelson RE.** Certification and identification of the embryo. 3<sup>rd</sup> ed., Illinois,USA. In: Manual of the international embryo transfer society. 1998 pp. 103-116.

**Rondeau M.,** Guay P., Goff A., Cooke G. Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. *Theriogenology* 1995; 44:351-366

**Shea BF.** Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*. 1981, 1: 31-35.

**Soto E.** La microscopia confocal. *Elemento* 1993, 17:35-39.

**Spell AR.,** Beal WE., Corah LR and Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. 2001, 56:287-297

**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.

**Van Soom A.,** Ysebaert MT., Vanhoucke-De Medts A., Delval A., Van Langendonck A., Donnay I., Vanroose G., Bols PEG. and Kruif Sucrose-induced shrinkage of in vitro

produced bovine morulae: Effect on viability, morphology and ease of evaluation. *Theriogenology*. 1996, 46; 7: 1131-1147.

**Van Soom.**, Boerjan ML., Bols PEJ., Vanroose G., Lein A., Coryn M., De Kruif A. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* 1997, 57: 1041-1049.

**Van Soom A.**, Mateusen B., Leroy J and De Kruif A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reprod Bio Med*. 2003, 6: 664-670

**Van Wagendonk-de Leeuw.** Evaluation of uniformity among persons in embryo grading from video recordings. *Theriogenology*. 1996, 45:230

**Visintin JA.**, Martins JFP., Bevilacqua EM., Mello, MRB., Nicacio AC., Assumpção MEOA. Cryopreservation of *Bos taurus* VS *Bos indicus* embryos: are they really different?. *Theriogenology*. 2002, 57: 345-359.

**Wiley LM.** Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K ATPase and the origin of nascent blastocle fluid. *Dev. Biol*. 1984, 105:330-342

**Wright JM.** Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*. 1981, 68: 251-306