



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE  
EMBRIONES F1 FRESCOS Y CONGELADOS  
UTILIZANDO EL CULTIVO EMBRIONARIO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A  
BLANCA GODÍNEZ CONTRERAS

TUTOR: CARLOS SALVADOR GALINA HIDALGO  
COMITÉ TUTORAL: NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA  
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.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a Dios, porque me ha dado la fortaleza para dar término a esta etapa de mi vida.

*“Las obras del Señor son grandes, y quienes las aman, las estudian”  
Salmo 111:2*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. Carlos Galina Hidalgo**, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de investigación, por todo el apoyo, consejos y la amistad que me ha brindado en todo este tiempo.

A mis padres, **Alfonso Godínez y María Contreras** quienes me han apoyado en todos los proyectos que he emprendido.

A mis hermanos y hermanas, pues con sus ejemplos me han inspirado a continuar preparándome en mis estudios.

A mis amigos y hermanos en la fe, que con su cariño, amistad y oraciones me han acompañado incondicionalmente en todo momento.

A todo el equipo de trabajo, por todos esos momentos inolvidables. Mil Gracias: Mariana Gutiérrez, Marco Alarcón, Flavio Bautista, Mónica Alamilla, Alex Jiménez, Abraham Cohen, Andrea Belmont y Paty López.

A los Doctores: Miguel Ángel Lammoglia, Norma Moreno, Ivette Rubio, Manuel Corro, Horacio León, porque gracias a su apoyo y todas las facilidades que me otorgaron, fue posible terminar este trabajo.

## **DECLARACIÓN**

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

MVZ. Blanca Godínez Contreras

## CONTENIDO

<b>I. Resumen</b>	<b>III</b>
<b>II. Abstract</b>	<b>V</b>
<b>III. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>IV. Revisión de literatura</b>	
4.1 Evaluación morfológica de los embriones	<b>4</b>
4.2 Muerte celular	<b>6</b>
4.3 Proliferación celular	<b>8</b>
4.4 Cultivo embrionario	<b>11</b>
4.5 Congelación	<b>12</b>
<b>V. Objetivos</b>	
5.1 Objetivo general	<b>15</b>
5.2 Objetivo particular	<b>15</b>
5.3 Hipótesis	<b>15</b>
<b>VI. Material y métodos</b>	
6.1 Fase de campo	<b>16</b>
6.2 Fase de laboratorio	<b>19</b>
6.3 Análisis estadístico	<b>22</b>
<b>VII. Resultados</b>	
7.1 Fase de campo	<b>23</b>
7.2 Evaluación durante el cultivo de embriones frescos	<b>23</b>
7.3 Embriones congelados	<b>27</b>
7.4 Evaluación durante el cultivo de embriones congelados	<b>27</b>
<b>VIII. Discusión</b>	<b>31</b>
<b>IX. Conclusiones</b>	<b>39</b>
<b>X. Literatura citada</b>	<b>40</b>

### Lista de cuadros, figuras y gráficas

Figura 1	Protocolo de superovulación para colecta de embriones	17
Figura 2	Embriones F1 frescos al inicio del cultivo y al finalizar el cultivo	24, 25
Figura 3	Embriones de cada clasificación mostrando los núcleos positivos a las pruebas de TUNEL (núcleos verdes) y BrdU (núcleos rojos).	26
Figura 4	Embriones F1 criopreservados al inicio y al término del cultivo	28, 29
Cuadro 1	Número de embriones para los grupos testigos y experimentales	20
Cuadro 2	Media $\pm$ DE de núcleos positivos a TUNEL y BrdU en embriones frescos	27
Cuadro 3	Media $\pm$ DE de núcleos positivos a TUNEL y BrdU en embriones congelados	29
Gráfica 1	Porcentaje de embriones colectados en fresco y clasificados en tres categorías: Buenos, regulares y malos	23

## I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de embriones de bovino obtenidos en fresco y congelados, durante un periodo de cuatro horas utilizando un medio de cultivo. Se realizaron dos experimentos, el primero con embriones frescos para los cuales, 14 hembras de raza Brahman fueron sometidas a un programa de sincronización, superovulación e inseminación artificial. La colecta de embriones se realizó a los 7 días post inseminación obteniéndose un total de 46 embriones los cuales se clasificaron como buenos (n=24), regulares (n=14), y malos (n=8). Se formó el grupo experimental con 19 embriones buenos, 9 regulares y 4 malos, el grupo testigo quedó integrado con 5 embriones buenos, 5 regulares y 4 malos.

El segundo experimento estuvo formado por 47 embriones congelados, provenientes de una fuente comercial del estado de Chiapas, de los cuales 20 buenos y 16 regulares formaron el grupo experimental, 6 embriones buenos y 5 regulares formaron el grupo testigo.

Los embriones testigo de los experimentos 1 y 2 se procesaron por la técnica TUNEL–BrdU para cuantificar las células en apoptosis y en proliferación. Los embriones tanto frescos como congelados de los grupos experimentales (n= 68), se cultivaron en medio McCoy® a 37° C con 60% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Se observó la morfología así como el grado de desarrollo al inicio y al término del tiempo de cultivo, posteriormente se procesaron con la técnica de TUNEL-BrdU.

En el experimento 1, el 74% (n= 14) de los embriones buenos y 60% (n= 5) de los regulares se mantuvieron viables durante las cuatro horas de cultivo; mientras que el 26% (n= 5) de los buenos y 40% (n= 4) de los regulares mostraron cambios degenerativos. Con los embriones de mala calidad el 100% (n= 4) degeneró durante el cultivo. Al comparar el número de núcleos TUNEL-BrdU positivos entre el grupo testigo y experimental, no se encontraron diferencias significativas.

En el experimento 2, el 54% de los embriones buenos (n= 11) y el 42% de los regulares (n= 7) se mantuvo viable durante el cultivo, mientras que el 46% de los buenos (n= 9) y el 68% de los regulares (n= 9) mostraron cambios degenerativos a las 4 horas del cultivo. Al comparar el número de núcleos TUNEL-BrdU positivos



entre el grupo testigo y experimental, no se encontraron diferencias significativas en ninguna clasificación.

Por lo tanto, se puede concluir que el cultivo embrionario empleado durante cuatro horas, en los embriones producidos *in vivo*, permite seleccionar aquellos que tienen posibilidades de continuar con un desarrollo favorable de los que se encuentran en un proceso de degeneración. En el caso de los embriones congelados, éste método puede ser utilizado como un control de calidad en aquellos embriones que se han almacenado durante periodos largos de tiempo y su viabilidad se encuentre comprometida.

Palabras clave: Bovino, embriones F1, cultivo, congelación, TUNEL - BrdU.

## II. ABSTRACT

The aim of this study was to assess the viability of fresh and frozen bovine embryos for a period of four hours using embryo culture. Two experiments were conducted, the first with fresh embryos; to this effect 14 Brahman cows were subjected to a synchronization, superovulation and artificial insemination programs. The collection of embryos was performed at 7 days post insemination obtaining a total of 46 embryos which were classified as good (n = 24), fair (n = 14) and poor (n = 8). The experimental group was formed with 19 good embryos, 9 fair and 4 poor, the control group was composed with 5 good, 5 fair and 4 poor embryos.

The second experiment consisted on assessing 47 frozen embryos, from a commercial source in Chiapas, including 20 good and 16 fair embryos; 6 good and 5 fair formed the control group.

Control embryos in the experiments 1 and 2 were processed by the TUNEL and BrdU techniques to quantify the apoptosis and cell proliferation. The fresh and frozen embryos in the experimental groups (n = 68), were cultured in McCoy media at 37°C with 60% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. Morphology and degree of development was recorded and at the end of culture was processed with TUNEL-BrdU techniques.

In experiment 1, 74% (n = 14) of good embryos and 60% (n = 5) of the ones classified as fair remained viable during the four hours in the culture media, whilst 26% (n = 5) of the good and 40% (n = 4) of the fair ones showed degenerative changes. With poor-quality embryos 100% (n = 4) degenerated during culture. When comparing the number of BrdU-TUNEL positive nuclei between the experimental and control group, there were no significant differences.

In experiment 2, 54% of good embryos (n = 11) and 42% of the fair (n = 7) remained viable during culture, whilst 46% of the good (n = 9) and 68% of the fair embryos (n = 9) showed degenerative changes within 4 hours after culture. When comparing the number of BrdU-TUNEL positive nuclei between the experimental and control group, no significant differences were observed in any of the categories.

In conclusion, culture of fresh embryos can be used as a test to confirm an adequate diagnosis by stereoscopic microscopy. But further can be of assistance in clarifying those wrongly classified by the above technique. In the case of frozen embryos, culture can be used as a method for quality control in those cells stored for long periods of time.

Keywords: Cattle, F1 embryos, embryo culture, freezing, TUNEL, BrdU

### III. INTRODUCCIÓN

La ganadería en las áreas tropicales de México es mayormente de tipo extensivo, poco especializada y depende de las variaciones climáticas. Esto trae como consecuencia una disponibilidad estacional de los nutrientes necesarios para el crecimiento, desarrollo y reproducción del rebaño bovino. Uno de los factores que limita la producción de los bovinos en el trópico es su baja eficiencia reproductiva, la cual se caracteriza por un porcentaje bajo de partos, edad avanzada al primer parto e intervalo entre partos prolongados, lo cual podría mejorarse si se aplica un manejo adecuado (Roman 1981). Por otra parte, las razas de bovino de origen cebuino (*Bos indicus*) y criollo son las que predominan en estas regiones debido a su capacidad para resistir las altas temperaturas y enfermedades parasitarias. Sin embargo, sus parámetros productivos y reproductivos son notablemente bajos en comparación con las razas europeas (Barros *et al.*, 2006; Madalena *et al.*, 1989). Numerosos estudios coinciden en que las cruza media sangre entre ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* (F1) presentan comportamiento productivo y reproductivo superior, así como mejor adaptación al medio ambiente (Cunningham 1989; Gutiérrez *et al.*, 2001), sin embargo, es difícil mantener el vigor híbrido de esta cruce en las generaciones subsecuentes. Para disminuir este efecto, se han hecho esfuerzos para implementar programas de Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones (MOET) en las regiones tropicales del país, teniendo resultados muy variables, debido principalmente a la poca información disponible en el ganado cebuino, lo cual crea la necesidad de perfeccionar y adaptar dichas tecnologías con el fin de mejorar la eficiencia reproductiva de los hatos.

En los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones en ganado *Bos taurus* se han reportado tasas de preñez que van desde un 40% hasta un 70% partiendo de embriones transferidos en fresco (Spell *et al.*, 2001; Hasler 2001). En cambio, estudios realizados en ganado *Bos indicus* han reportado tasas de preñez desde 27% hasta 65% (Alarcón 2008; Roa 1997; Peres 2006;) Estas diferencias pueden deberse a factores ya sean ambientales, nutricionales, de

manejo o bien por factores inherentes al embrión (grado de desarrollo y calidad) (Bényei *et al.*, 2006).

La evaluación de la calidad y desarrollo embrionario es un factor de gran relevancia que impacta de manera directa en el éxito o fracaso de los programas de transferencia de embriones. Se ha mostrado en diversos estudios que las tasas de preñez aumentan cuando la calidad de los embriones seleccionados para este propósito es excelente y buena. (Putney *et al.*, 1988; Putney *et al.*, 1989; Lindner and Wrigth 1983). Sin embargo, la evaluación basada únicamente en la morfología del embrión es muy subjetiva llegándose a encontrar una variabilidad de hasta el 30% entre evaluadores expertos (Farin *et al.*, 1995), encontrándose mayor dificultad para diferenciar entre los embriones de buena y regular calidad. En un estudio realizado por Rondeau y col., (1995) quienes evaluaron el metabolismo de los embriones encontraron que el 47% de los que se consideraban de buena calidad tuvieron una actividad metabólica anormal, característica fisiológica que no puede ser detectada por medio del microscopio estereoscópico.

La calidad de los embriones puede ser evaluada de diferentes maneras de acuerdo con el destino del embrión; si el destino es la transferencia u otra biotecnología asociada, la técnica a utilizar deberá permitir el desarrollo normal del embrión (evaluación morfológica, grado de desarrollo, pruebas metabólicas, resistencia a la congelación). Por otro lado, existen las técnicas invasivas, las cuales permiten obtener datos más exactos sobre el embrión, haciendo de estas técnicas ideales para la investigación pero no aplicables para su transferencia (microscopía electrónica, detección de proliferación y muerte celular, Hibridación *In Situ* de Fluorescencia ó FISH) (Palma 2008).

No obstante de la correcta evaluación de los embriones, es importante tener en cuenta que existen casos donde los embriones de buena calidad no concluyen en una preñez. Un estudio realizado por Reichenbach (2003) sugiere que un camino para incrementar la capacidad de desarrollo de los embriones parcialmente degenerados es cultivándolos antes de transferirlos. En este sentido, los cultivos embrionarios han sido ampliamente estudiados para la producción de embriones *in vitro* principalmente en ganado europeo (Pontes 2009; Farin 1997; Lane 2006).

En la actualidad existen diferentes cultivos comerciales que permiten el desarrollo de éstos hasta etapas en las que podrían ser transferidos; sin embargo los resultados de esta biotecnología no han sido muy alentadores ya que las tasas de preñez varían de un 20% a un 40% (Goto *et al.*, 1988).

Recientemente Contreras y col., (2008), realizaron un estudio sobre la viabilidad de embriones F1 de bovino criopreservados, descongelados y mantenidos en cultivo, la morfología fue monitoreada durante 24 horas registrando los cambios cada 30 minutos durante las primeras dos horas y posteriormente cada hora, los hallazgos de este estudio muestran que en las primeras siete horas de cultivo, los embriones de buena y regular calidad mantuvieron un desarrollo favorable, pasando de la etapa que se encontraban hacia una más avanzada, en cambio los embriones de mala calidad sólo tuvieron un 25% de desarrollo y en las primeras dos horas de cultivo presentaron cambios degenerativos. En dicho estudio, los autores recomiendan un periodo de cultivo de cuatro a seis horas ya que este tiempo fue suficiente para que los embriones se desarrollaran o bien, degeneraran.

Con base en los resultados anteriormente descritos, el presente trabajo propone la utilización del cultivo embrionario durante un periodo de cuatro horas, como una aplicación práctica para la evaluación de embriones de tipo F1 cuando se tenga alguna duda en la clasificación de los mismos, así como una medida de control de calidad antes de la transferencia embrionaria.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Evaluación morfológica de los embriones

La Transferencia de Embriones (TE) que se practica de manera comercial en el ganado bovino, tiene la finalidad principal de incrementar el número de crías que tienen las hembras genéticamente superiores y así lograr un mejoramiento del hato en un periodo corto (Hasler 1992; Galli 2003; Vivanco 2000). Un factor crítico para lograr que un programa de TE tenga resultados óptimos es la adecuada clasificación de los embriones que son colectados de las hembras donadoras (Cutini *et al.*, 2000). Los técnicos que trabajan en condiciones de campo utilizan el microscopio estereoscópico para inferir la calidad de los embriones basándose en una evaluación de la morfología celular y estructural del embrión como son el color de las células, la homogeneidad y tamaño de los blastómeros, la granulación citoplasmática, el grado de fragmentación de los blastómeros y la integridad de la zona pelúcida. Estas características, además del tiempo que transcurre entre una etapa del desarrollo y otra, son usadas como indicadores de la salud y calidad del embrión (Occhio *et al.*, 1999; Overstrom 1996).

De acuerdo con la International Embryo Transfer Society (IETS), los embriones pueden ser clasificados morfológicamente en 4 categorías o grados de calidad donde el grado 1 es para aquellos embriones de excelente y buena calidad, el grado 2 es para los de calidad regular, el grado 3 para los de calidad pobre y finalmente el grado 4 se asigna a los embriones no transferibles, o sea, los que al momento de la colecta se encuentran muertos, degenerados o que no fueron fertilizados (Robertson y Nelson 1998). Se considera que los embriones de buena calidad son aquellos que presentan una forma esférica, con células simétricas y uniformes en tamaño, color y textura, pueden observarse algunas imperfecciones como algunos blastómeros extruidos, forma irregular así como pocas vesículas. Los embriones regulares o grado 2, presentan algunos blastómeros rugosos, varias vesículas y algunas células degeneradas. Los de mala calidad son aquellos embriones que muestran mayores irregularidades morfológicas, un gran número

de blastómeros extruidos, células degeneradas, variación en el tamaño de los blastómeros, numerosas vesículas, sin embargo la masa celular interna aún parece viable (Lindner y Wrigth 1983).

Debe considerarse que existe una relación directa entre la calidad de los embriones y el porcentaje de gestación, teniendo resultados que van desde un 54% hasta un 73% al transferir embriones de buena y excelente calidad, en comparación con porcentajes del 42% y 59% cuando se utilizan embriones regulares. Finalmente, con embriones de mala calidad se han obtenido resultados que oscilan entre el 20% y 30% de gestación (Lindner y Wrigth 1983; Hasler *et al.*, 1987; Hasler *et al.*, 1995; Reichenbach *et al.*, 1992)

La evaluación morfológica a través del microscopio estereoscópico resulta ser un método rápido, simple, de bajo costo y no invasivo pero tiene la desventaja de ser poco preciso, ya que entre los evaluadores con experiencia estos concuerdan sólo en el 68.5% de los casos, encontrándose la mayor variación para clasificar los embriones regulares (Farin *et al.*, 1995). Aunado a lo anterior se ha observado que entre un 20 y 30% de los embriones que se clasifican de excelente o buena calidad no logran producir una gestación, mientras que alrededor de un 30% de embriones clasificados de mala calidad si concluyen en una gestación (Lindner y Wrigth 1983; Elsdén y Seidel 1990), lo cual indica que a pesar de que la evaluación basada únicamente en la morfología es el método más utilizado para predecir el porcentaje de preñez, tiene algunas limitaciones para determinar la viabilidad de los embriones.

Las diferencias morfológicas entre los embriones pueden ser estimadas de manera muy precisa mediante un análisis ultraestructural de las células (Bhojwani *et al.*, 2007) donde se considera que las células de pobre calidad tienen núcleos con una baja tasa de actividad de transcripción, un gran número de gotas lipídicas intracitoplasmáticas, mitocondrias inmaduras, así como un pobre desarrollo de uniones complejas y de microvellosidades (Abe *et al.*, 2002). Con el fin de tener un mejor conocimiento sobre las estructuras embrionarias, para de esta manera tener una evaluación más precisa, diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de utilizar herramientas que proporcionen mayor información al respecto, tal



es el caso del estudio realizado por Aguilar y col., (2002) en embriones de ganado *Bos indicus*, donde se comparó la evaluación del embrión por medio del microscopio estereoscópico, microscopio de contraste de fases y microscopio electrónico. Los resultados arrojados por este estudio mostraron que con el microscopio estereoscópico se evalúa incorrectamente el 50% de los embriones buenos, mientras que no encontraron diferencias entre la evaluación con microscopio de contraste de fases y el electrónico. Sin embargo, en otro estudio realizado por López – Damián y col., (2008) donde se utilizaron embriones de ganado *Bos taurus*, se encontró que en la evaluación ultraestructural hubo un incremento del 14% en los embriones de buena calidad, mientras que con los embriones regulares observaron una disminución del 7%. En el mismo estudio, los autores no reportan hallazgos en los embriones de mala calidad. Las diferencias entre estos estudios pueden sugerir que si existen variaciones al evaluar los embriones *Bos taurus*, éstas pueden ser mayores cuando se analicen embriones de tipo *Bos indicus* haciendo necesario adaptar o establecer los lineamientos que se utilicen para evaluar las características propias de ésta especie.

Estos hallazgos muestran que la evaluación ultraestructural de las células embrionarias es un método bastante preciso, sin embargo, no puede ser aplicado a los embriones cuyo destino es la transferencia, ya que requiere de tratamientos químicos los cuales detienen completamente el desarrollo del embrión.

## **4.2 Muerte celular**

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

contraste, la apoptosis se caracteriza por la separación de las células preapoptóticas, las cuales adquieren una forma más redondeada, la cromatina y el citoplasma se condensan, hay fragmentación nuclear debido a la acción de enzimas endonucleasas y ausencia de células vecinas afectadas; lo cual indica que la muerte celular programada es un proceso ordenado donde la célula apoptótica es fagocitada por macrófagos o por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria (Matwee *et al.*, 2000; Yang y Rajarnabendran 1999; Celestinos *et al.*, 2002). La apoptosis o muerte celular programada durante los primeros estadios del desarrollo embrionario es un mecanismo fisiológico destinado a eliminar células anormales o con un potencial inadecuado de desarrollo (Hardy 1997; Majno and Joris 1995). En los embriones de bovino se han reportado anomalías cromosómicas en el 28% de los embriones producidos *in vivo* y en el 72% de los embriones producido *in vitro* (Viuff *et al.*, 1999) mismas que son eliminadas por medio de la apoptosis.

Por otra parte, la incidencia de apoptosis varía con la edad del embrión y con el número de células, Byrne y col., (1999) encontraron la presencia de células apoptóticas en embriones de 9 a 16 células, pero no en etapas anteriores y en diversos estudios se ha encontrado que en la etapa de blastocisto es donde se encuentra el mayor índice de apoptosis. (Hardy 1997; Matwee *et al.*, 2000; Gjørret *et al.*, 2003)

La apoptosis está muy relacionada con la calidad del embrión, Byrne y col., (1999) demostraron que los blastocistos con menor número de células y mayor porcentaje de apoptosis, poseen menor potencial de desarrollo al ser cultivados. Así, en un blastocisto de buena calidad el porcentaje de células muertas es menor al 10% y en uno de mala calidad es de 30% aproximadamente (Celestinos *et al.*, 2002).

En los embriones de bovino se ha utilizado la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferasa mediated dTUP nick-end labeling) para detectar la muerte celular por apoptosis y de esta manera determinar o corroborar el grado de calidad dado por métodos de microscopía (Márquez *et al.*, 2005; Contreras *et al.*, 2008; Gutiérrez 2009), la técnica de TUNEL posibilita evaluar la fragmentación del

ADN in situ. A pesar de que en la necrosis también existe fragmentación del ADN, ésta es inespecífica, además de estar acompañada por cariólisis (el núcleo de la célula no se tiñe y la cromatina se difunde en el citoplasma) (Kumar 1997, Cheville 1989; Elmore 2007). Por el contrario, la fragmentación del ADN causada por apoptosis ocurre en el extremo 3'-OH dándole una apariencia de bandas escalonadas con separaciones a intervalos regulares de 200 pares de bases (Wyllie 1980; Avila 2000). Con la técnica de TUNEL se incorpora un nucleótido marcado (fluoresceína-dUTP) en este extremo y la reacción se hace evidente con la enzima TdT (Desoxinucleotidil transferasa) permitiendo de esta manera su localización y cuantificación (Jurisicova *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 1999; Celestinos *et al.*, 2002).

En diversos estudios se ha visto que la apoptosis evaluada mediante la técnica de TUNEL es directamente proporcional a la calidad del embrión, así, aquellos embriones que tienen mayor cantidad de células apoptóticas tienen menor probabilidad de terminar en una gestación (Márquez *et al.*, 2005). Si bien, éste método es bastante preciso para medir el potencial de desarrollo del embrión, requiere de su sacrificio haciéndolo inviable para los embriones destinados a la transferencia, ya que para llevar a cabo esta técnica es necesario fijar las células en una solución de paraformaldehído (Gavrieli *et al.*, 1992).

Por otro lado, en un estudio realizado por Márquez y col., (2004), observaron que el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido tiene un efecto detrimental en la calidad del embrión, lo cual produce una variabilidad muy grande en los resultados en cuanto a fertilidad y porcentaje de gestaciones esperados. Esto puede explicarse debido a que en algunos casos la transferencia se realiza cuando el daño celular ya ha comprometido la viabilidad del embrión afectando de manera negativa el éxito del programa (Contreras *et al.*, 2008).

### **4.3 Proliferación celular**

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que conducen al crecimiento de la célula y su división en dos células hijas. Las células que se encuentran en el

ciclo celular se denominan proliferantes y las células que no están en división no se considera que estén dentro del ciclo celular (fase  $G_0$  o quiescentes) (Lodish 2005). El ciclo celular se inicia en el instante en que aparece una nueva célula, descendiente de otra que se divide, y termina en el momento en que dicha célula, por división subsiguiente, origina dos nuevas células hijas.

La célula puede encontrarse en dos estados claramente diferenciados:

- El estado de división, llamado fase M (mitosis).
- El estado de no división o interfase. En ésta fase la célula realiza sus funciones específicas y, si está destinada a entrar en división celular, comienza por realizar la duplicación de su ADN (Paniagua *et al.*, 2002).

La interfase es el período comprendido entre divisiones celulares, es la fase más larga ocupando casi el 95% del ciclo celular y transcurre entre dos mitosis. Esta fase comprende tres etapas:

- Fase  $G_1$  (del inglés Growth o Gap 1): Es la primera fase del ciclo celular en la que existe crecimiento con síntesis de proteínas y de ARN. Es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular.
- Fase S (del inglés Synthesis): Es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN.
- Fase  $G_2$  (del inglés Growth o Gap 2): Durante esta fase continúa la síntesis de proteínas y ARN. Al final de este período se observan al microscopio cambios en la estructura celular que indican el principio de la división. Termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis. La carga genética se duplica y se pueden observar ahora dos cromátidas en cada cromosoma (Alberts 2004).

La mitosis normalmente concluye con la formación de dos núcleos separados (cariocinesis), seguido de la división del citoplasma (citocinesis), para formar dos células hijas (Blow and Tanaka 2005)

En el desarrollo embrionario del bovino, después del momento de fertilización comienza una serie de divisiones mitóticas asincrónicas las cuales dan lugar a nuevas células denominadas blastómeros (Gilbert 2005). Los embriones que siguen un desarrollo normal se espera que tengan dos células 34 horas después de la fertilización, de tres a cuatro células a las 46 horas, de cinco a ocho células a las 61 horas, de nueve a 16 células a las 115 horas, las mórulas y los blastocistos se encontrarán a las 149 y 192 horas respectivamente después de la fertilización (Grisart *et al.*, 1994).

Con fines de investigación de células cancerígenas, se han utilizado en diferentes tejidos algunos marcadores tales como el Ki-67, el Índice de Mitosis (MI), el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) y el 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) para detectar las células que se encuentren en proliferación y determinar si es un crecimiento anormal (Lardelli *et al.*, 1994; Heron *et al.*, 1995; Boticelli *et al.*, 1998). En los embriones de bovino se ha utilizado el PCNA en conjunto con el Ioduro de Propidio (PI) para obtener mayor información del potencial de desarrollo del embrión (Markkula *et al.*, 2001; Makarevich and Markkula 2002). En estos estudios los autores observaron que existen desórdenes en el desarrollo normal que no son observados a través de la evaluación morfológica, lo cual confirma la necesidad de tener un mejor control de la calidad de embriones que son destinados a la transferencia.

El BrdU es un nucleótido sintético análogo de la timidina el cual, durante la fase de síntesis reemplaza a la timidina en la cadena del ADN y permite realizar un seguimiento de la proliferación celular tanto *in vivo* como *in vitro* (Yu 1992; Gratzner 1982). Sin embargo, a pesar de ser una técnica no radiactiva y de fácil aplicación, no hay datos publicados sobre su utilización en la detección de células proliferativas en los embriones de bovino.

#### 4.4 Cultivo embrionario

Históricamente se han utilizado los medios de cultivo en el campo de la reproducción asistida en bovinos para madurar los ovocitos que son obtenidos por medio de punción folicular y fertilizarlos *in vitro*, así como para favorecer el desarrollo de los embriones hasta etapas en las que pueden ser transferidos (Goto *et al.*, 1988; Thompson 1996).

Debido al complejo metabolismo de los embriones, se han desarrollado medios de cultivo suplementados con diversos componentes como el suero fetal bovino, hormonas, aminoácidos, cocultivo con células epiteliales u oviductales, teniendo éstos componentes una gran variedad en el efecto sobre la calidad y viabilidad de los embriones (Mastromonaco *et al.*, 2004). Estudios con embriones producidos *in vitro* reportan que la calidad y la tasa de preñez son menores que aquellos resultados de embriones producidos *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002). Por esta razón, el desarrollo de sistemas de cultivo que favorecen el desarrollo embrionario y la producción *in vitro* de los mismos, sigue siendo un tema de investigación. Al respecto, varios autores (Menezo and Khatchadourian 1991; Palasz 1996; Thompson 1996) coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son la osmolaridad, pH, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, agua, hormonas, factores de crecimiento y fuentes de energía, las cuales pueden ser el lactato, piruvato y/o glucosa (Palasz 1996).

Se ha observado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo (Reiger *et al.*, 1992; Gardner 1998; Krisher and Bavister 1998; Lane and Gardner 2000; Thompson 2000).

Pereira y col., (2005) y Brandao *et al.*, (2004) evaluaron diferentes sistemas de cultivo en embriones a diferentes etapas de desarrollo, en dichos estudios se demostró que los embriones poseen la capacidad de desarrollarse y mejorar sus características morfológicas, incluso, algunos embriones llegaron a etapas en las que da inicio la diferenciación de varios linajes celulares.

En otro estudio realizado por Reichenbach (2003) se sugiere que un camino para incrementar la capacidad de desarrollo de los embriones parcialmente degenerados es cultivándolos antes de transferirlos. Observaciones recientes establecen que los sistemas de cultivo simples pueden ser utilizados para mantener los embriones después de la colecta y que puede promover la actividad mitótica e incrementar el número de células totales en los embriones de pobre calidad después de 24 horas de cultivo (Romo *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2004).

Al respecto, un estudio realizado por Álvarez y col., (2008) donde cultivaron embriones producidos tanto *in vitro* como *in vivo* de grado 3, concluyen que el cultivo durante un periodo corto es un método conveniente para identificar los embriones de pobre calidad que todavía tienen oportunidad de continuar su desarrollo después de la transferencia.

De la misma manera, un estudio realizado por Contreras y col., (2008) donde se empleó un sistema de cultivo comercial durante 24 horas como método para evaluar la viabilidad en los embriones descongelados producidos *in vivo*, encontraron que los embriones clasificados por microscopía estereoscópica como buenos y regulares no presentaron cambios desfavorables en el desarrollo durante las primeras 7 horas, mientras que los de mala calidad a las 2 horas de cultivo comenzaron a presentar cambios degenerativos.

Por lo mismo, el cultivo embrionario aplicado durante un periodo corto es un método no invasivo con el cual se puede determinar la viabilidad de los embriones previo a su transferencia (Palma 2008; Contreras *et al.*, 2008).

#### **4.5 Congelación**

La criopreservación y el almacenamiento de embriones a bajas temperaturas en nitrógeno líquido presenta numerosas ventajas, tanto desde el punto de vista biológico como comercial, ya que permite la conservación de razas o especies en riesgo de extinción, elimina las patologías que normalmente se asocian al mantenimiento de animales vivos, facilita el intercambio genético eliminando el

estrés por transporte de los animales vivos y permite tener embriones disponibles para futuras transferencias (Monforte 2003).

Los diferentes protocolos para congelar embriones deben tomar en cuenta la protección de las células ante los principales efectos perjudiciales del proceso mismo, como lo es la formación de hielo intracelular, deshidratación de las células y los efectos tóxicos causados por los crioprotectores (Dobrinsky *et al.*, 1997; Dobrinsky 1996; Pollard and Leibo 1994; Whittingham 1980).

Existen protocolos convencionales para la congelación de embriones donde se utilizan ya sea el glicerol o el etilenglicol como agentes crioprotectores, éste último tiene la ventaja de ser utilizado para la transferencia directa. Estudios realizados para comparar la eficacia entre ambos métodos han mostrado que no hay diferencias significativas al utilizar uno u otro método sobre la tasa de gestación (Larocca y Fernández 1997). Sin embargo, los resultados alcanzados en cuanto a porcentaje de gestaciones cuando se utilizan embriones congelados, sigue siendo menor que cuando se transfieren embriones en fresco (Hasler *et al.*, 1995; Wurth *et al.*, 1994).

Otro método desarrollado para la criopreservación es la vitrificación o congelación ultrarrápida, que comúnmente utiliza como agente protector de las células al etilenglicol. Un beneficio importante de la congelación ultrarrápida es que no hay formación de cristales de hielo, además de la reducción en el tiempo requerido para equilibrar los embriones y llevarlos hasta los  $-196^{\circ}\text{C}$  (Fahy *et al.*, 1984; Rall and Fahy 1985). Un hallazgo en cuanto al uso del etilenglicol como crioprotector en embriones producidos *in vitro*, es que resultó ser más favorable para éstos últimos que para los embriones producidos *in vivo*, donde se observaron mayores daños en la capa de células del trofoblasto (Sommerfeld and Niemann 1999).

Visintin y col., (2002) observaron que durante la vitrificación, los embriones de vacas Holstein y Nelore exhiben condiciones morfológicas similares. La congelación de los embriones *Bos taurus* y *Bos indicus* aparentemente mantiene su desarrollo y estructura comparado con embriones en fresco, sin embargo un análisis más detallado muestra que las células embrionarias principalmente en



ganado *Bos indicus* de raza Nelore muestra alteraciones significativas, con signos de degeneración y muerte celular, en comparación con embriones frescos.

Los reportes de gestación con el uso de la vitrificación mencionan entre un 40 y un 55% de preñez (Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1995), lo cual no difiere en gran medida con los resultados obtenidos por medio de los métodos convencionales de congelación, sin embargo su uso cada vez más frecuente se debe a la reducción en el tiempo empleado para congelar embriones, siendo en muchas ocasiones menor a 25 minutos (Contreras 2006).

En la congelación convencional con glicerol, éste debe ser retirado de los embriones antes de la transferencia (Jacokowsky *et al.*, 1980; Schneider *et al.*, 1983) de no ser así, el contacto con el medio uterino produce una sobrehidratación que provoca daños celulares irreversibles para el embrión. Este proceso es realizado en el laboratorio mediante una serie de pasos que resultan muchas veces tediosos y complicados ya que los embriones en soluciones equimolares tienden a flotar cerca de la superficie complicando su manipulación (Larocca y Fernández 1997).

Para evitar dichas complicaciones en la descongelación, se comenzó a utilizar el etilenglicol como agente crioprotector el cual, por su alto coeficiente de permeabilidad permite la transferencia sin la necesidad de extraer el embrión de la pajilla, esto ha permitido que la transferencia de embriones sea más ágil sin embargo tiene la desventaja de no hacer posible la visualización del embrión y por ende no tener conocimiento sobre su viabilidad antes de ser transferido (Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1995).

Todo lo anteriormente descrito, nos lleva a concluir en la necesidad imperante de realizar evaluaciones posteriores a la descongelación y previas a la transferencia que sean accesibles, prácticas y a su vez que permitan obtener mayor información sobre la viabilidad de los embriones sin que se comprometa el desarrollo normal del mismo. Con el cultivo embrionario pueden ser evaluadas diferentes características como morfología, etapa y grado de desarrollo, así como la calidad de los embriones antes de su transferencia y/o congelación, determinando así su viabilidad en tan sólo unas horas (Contreras *et al.*, 2008).

## V. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

### 5.1 Objetivo general

- Evaluar la viabilidad de embriones F1 frescos y congelados mediante el cultivo embrionario empleado durante cuatro horas.

### 5.2 Objetivos particulares

- Utilizar el cultivo durante 4 horas en embriones frescos de diferentes calidades y posteriormente evaluar su viabilidad.
- Utilizar el cultivo durante 4 horas en embriones congelados de diferentes calidades y evaluar su viabilidad.

### 5.3 Hipótesis

- El cultivo embrionario utilizado durante 4 horas permite evaluar la viabilidad de embriones F1 frescos y congelados, para de esta manera discriminar aquellos susceptibles de sufrir degeneración de los que tienen posibilidades de continuar con un desarrollo favorable.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Fase de campo

#### Localización

La producción de embriones se llevó a cabo en el rancho “Las Conchitas” ubicado en el municipio de Papantla estado de Veracruz y en el rancho “Lindavista” Ubicado en el municipio de Álamo Temapache, Ver.

El municipio de Papantla se encuentra ubicado en la zona norte del estado, en la sierra Papanteca, en las coordenadas 20° 27' latitud norte y 97° 19' longitud oeste, a una altura de 180 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Cazonces de Herrera; al este con Tecolutla y Gutiérrez Zamora; al sureste con Martínez de la Torre; al sur con el Estado de Puebla; al oeste con Espinal, Coatzintla y Poza Rica; al noroeste con Tihuatlán. Su clima es cálido-regular con una temperatura promedio de 20.8° C; su precipitación pluvial media anual es de 1,160 mm. El municipio de Álamo Temapache se ubica en la zona norte del estado de Veracruz, en las coordenadas 20° 55' latitud norte y 97° 41' longitud oeste a una altura de 40 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Tepetzintla, Cerro Azul y Tamiahua, al este con Tuxpan, al sur con Tihuatlán, Castillo de Teayo y el Estado de Puebla, al suroeste con Ixhuatlán de Madero y al oeste con Chicontepec. El clima es cálido-extremoso, con una temperatura media anual de 24.3°C, y su precipitación pluvial media anual es de 1,391 mm.

#### Selección de donadoras

Los criterios para seleccionar a las donadoras fueron que tuvieran menos de 5 partos, con un periodo posparto mayor a 90 días, que no presentaran alteraciones o patologías en el aparato genital, que se encontraran vacías, ciclando y que presentaran una condición corporal de 2.5 a 3.5 en la escala del 1 al 5 propuesta por Edmonson y col., (1989). Bajo estas condiciones ingresaron 22 hembras *Bos indicus* al tratamiento superovulatorio.

## Superovulación e inseminación artificial

Una vez seleccionadas las hembras donadoras fueron sincronizadas mediante la administración de dos dosis de 100µg GnRH (Ovalyse, Pfizer México) vía intramuscular con un intervalo de 7 días entre cada dosis, 7 días después de la segunda aplicación de GnRH se administraron 25 mg de PGF2α (Lutalyse, Pfizer México) vía intramuscular para inducir la aparición del celo entre 48 a 72 horas después del tratamiento. Diez días después se detectó la presencia del cuerpo lúteo por medio de ultrasonografía transrectal con un equipo ALOKA SSD 500 y un transductor de 7.5 Mhz. Las vacas que no presentaron cuerpo lúteo no ingresaron al tratamiento superovulatorio. En el día 11 posterior al tratamiento de inducción del celo se inició con el programa de superovulación, el cual consistió en la administración de 280 mg de la Hormona Folículo Estimulante (FSH Folltropin –V Bioniche) cada 12 horas (am-pm) a dosis decrecientes durante los días 28, 29, 30 y 31. En el día 30 se administraron 2 dosis de 25 mg de PGF2α (am-pm) vía intramuscular con la finalidad de lisar el cuerpo lúteo e inducir nuevamente el celo. Las vacas que no presentaron celo fueron retiradas del programa, quedando un total de 14 animales que se inseminaron a las 12 y 24 horas con semen de toro Holstein de calidad probada, con la finalidad de obtener embriones de tipo F1.

### PROTOCOLO DE SUPEROVULACION

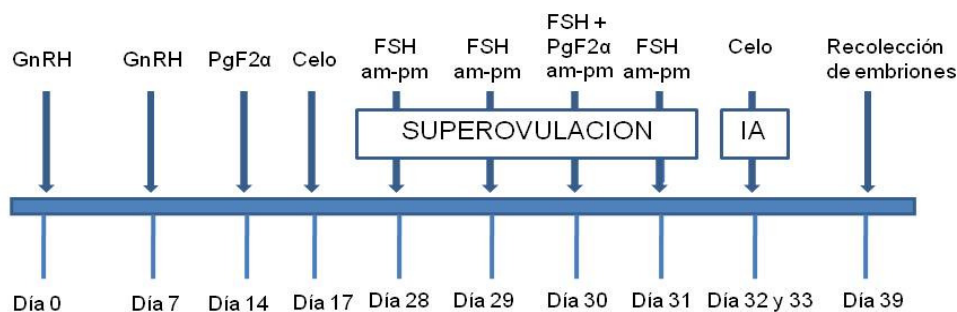


Figura 1. Protocolo de superovulación para colecta de embriones.

## **Colecta y evaluación de embriones**

Al séptimo día después de la primera inseminación, se realizó una evaluación de los ovarios por palpación rectal para estimar el número de los cuerpos lúteos y así determinar la respuesta superovulatoria, seleccionando a las vacas que tuvieran una respuesta mayor a dos cuerpos lúteos. En éstas vacas se aplicó una dosis anestesia epidural (5cc de clorhidrato de lidocaína al 2 %) a la altura de la última vértebra sacra y la primera coccígea. Se realizó un lavado con agua corriente en la región vulvar y se introdujo una sonda Foley del número 18 guiada por un estilete a través del cérvix hasta llegar al útero. Una vez localizada la sonda en el útero se retiró el catéter y se realizaron los lavados, para lo cual se permitió la entrada de aproximadamente 200 ml de medio Hartman al útero, se aplicó un ligero masaje en los cuernos uterinos para que los embriones que se encontraran alojados en las criptas o pliegues fueran arrastrados por la corriente del medio hacia un filtro, este procedimiento se repitió aproximadamente de 8 a 10 veces por vaca. Una vez completado los lavados se retiró la sonda y se administraron 25mg de PGF<sub>2</sub>α a cada vaca para provocar lisis de los cuerpos lúteos.

El filtro que contenía el medio con los embriones se llevó al laboratorio debidamente protegido de la luz solar y a continuación se realizó la búsqueda, para lo cual se vertió el contenido del filtro en cajas cuadrículadas y con ayuda de un microscopio estereoscópico a un aumento de 15x. Los embriones que fueron encontrados se colocaron en cajas de Petri de 35 x 10 mm de diámetro que contenían una solución de mantenimiento a temperatura ambiente (Holding Plus ® Bioniche, Animal Health. Canada Inc) y se procedió a su evaluación morfológica.

## **Evaluación de los embriones**

La clasificación de los embriones fue hecha por un técnico especialista con un microscopio estereoscópico, a un aumento de 60x, estableciéndose tres categorías para los embriones y una para estructuras no transferibles.

**Bueno.**- Embrión esférico, sin defectos en la zona pelúcida, con tamaño, color y textura uniformes, blastómeros sin o con pocas vesículas y la etapa de desarrollo del embrión coincide con el estadio de desarrollo esperado para el día de la colecta.

**Regular.**- Moderadas irregularidades, por lo menos el 50% de su masa celular debe estar intacta y viable, presencia de algunos blastómeros rugosos y/o extruídos, varias vesículas y algunas células degeneradas.

**Malo.**- Muchos o casi todos los blastómeros son rugosos, células degeneradas y/o de varios tamaños, numerosas vesículas, zona pelúcida dañada o rota pero todavía se logra distinguir la masa embrionaria, al menos cerca del 25 % debe estar intacta y viable.

**Estructuras no transferibles.**- Embriones que presentan estadios atrasados en su desarrollo con respecto al día de la colecta, zonas pelúcidas sin masa embrionaria y ovocitos no fertilizados.

## 6.2 Fase de Laboratorio

Se formaron dos grupos experimentales, en el primero se utilizaron los embriones colectados en fresco y para el segundo experimento se utilizaron embriones congelados.

Para el primer experimento se colectó un total de 46 embriones frescos, los cuales fueron transportados en refrigeración a 4° C al laboratorio de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. A continuación, se tomaron aleatoriamente 5 embriones clasificados de buena calidad, 5 regulares y 4 malos para formar el grupo testigo y el grupo experimental estuvo formado por 19 embriones buenos, 9 regulares y 4 malos.

Para el segundo experimento se utilizó un total de 47 embriones congelados en etilenglicol provenientes de una fuente comercial del estado de Chiapas. La descongelación se llevó a cabo extrayendo las pajillas almacenadas en nitrógeno líquido y manteniéndolas durante 10 segundos a temperatura ambiente para posteriormente sumergirlas en agua a una temperatura de 30° C durante 30 segundos. Los embriones se colocaron en medio One Step EmCare ICPBio® durante 5 minutos y finalmente se mantuvieron en Holding Plus ®

(Bioniche, Animal Health. Canada Inc) a temperatura ambiente. Se tomaron 6 embriones de buena calidad y 5 regulares para formar el grupo testigo, así mismo, el grupo experimental se formó con 20 embriones de buena calidad y 16 regulares.

Los embriones de los grupos control no fueron expuestos al medio de cultivo, una vez evaluados (exp. 1) o descongelados (exp 2) se les realizó la prueba de TUNEL- BrdU, mientras que los embriones de los grupos experimentales se cultivaron durante un periodo de cuatro horas post evaluación o descongelación.

La distribución de los embriones se muestra en el siguiente cuadro.

Clasificación	FRESCOS		CONGELADOS	
	Testigos	Experimental	Testigos	Experimental
Buenos	5	19	6	20
Regulares	5	9	5	16
Malos	4	4		
Total	14	32	11	36

Cuadro 1. Número de embriones para los grupos testigos y experimentales.

## Cultivo

Embriones tanto frescos como congelados que conformaron los grupos experimentales (n= 68) se colocaron individualmente en cajas de cultivo de 24 pozos sobre un filtro transparente de 0.4  $\mu\text{m}$  de poro (millicell-cm®) flotando en 0.5 ml de medio de cultivo con los siguientes componentes: medio McCoy® 5A modificado suplementado con 1 ml de suero fetal bovino y 200 U/ml de penicilina y 200  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina. La incubación se realizó a una temperatura de 37° C con 60% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de las cuatro horas de cultivo se monitoreó la morfología y el grado de desarrollo embrionario, registrando los cambios y documentando éstos con fotografías tomadas al inicio y al término del tiempo de cultivo, de acuerdo al método propuesto por Contreras y col., (2008).

### **Detección de proliferación celular (BrdU)**

El total de los embriones (n = 93) fueron tratados con una solución de Tritón X-100 diluida al 0.1% en agua destilada (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) durante 2 minutos para permeabilizar la zona pelúcida. A continuación fueron procesados de acuerdo a las instrucciones del estuche comercial 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labelling and Detection (ROCHE Diagnostics Kit, Indianapolis, IN, USA) para detectar el número de células que se encontraran en proliferación. Brevemente, los embriones se incubaron en una solución al 5% de BrdU (500 µl de BrdU en 9.5 ml de medio de cultivo) a 37° C durante 1 hora. Una vez concluido el periodo de incubación, los embriones se lavaron 3 veces durante 5 minutos en una solución de buffer de lavado incluido en el estuche. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario anti-BrdU y se dejó incubar durante 1 hora a 37° C. Los embriones se lavaron nuevamente con el buffer de lavado 3 veces durante 5 min en cada ocasión y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG Rodaminado durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó un tercer lavado en PBS, pH 7.4 tres veces durante 5 minutos y al finalizar se fijaron con paraformaldehído (Aldrich Chemicals Company Inc., USA) al 4% en PBS, pH 7.4 durante 30 minutos.

### **Detección de muerte celular por Apoptosis (TUNEL)**

Después del tratamiento para la detección de la proliferación celular, los embriones se lavaron 2 veces en PBS, pH 7.4 por 5 minutos y al término de los lavados se incubaron durante 1 hora a 37° C con 100 µl de solución de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, AP Mca. ROCHE Diagnostics Kit, Indianapolis, IN, USA). Se utilizo la técnica de TUNEL para cuantificar el número de células apoptóticas y de esta manera corroborar la calidad de los embriones utilizando los criterios descritos por Márquez (2003) donde se consideran de buena calidad, aquellos con un conteo menor a 14 células apoptóticas, de regular calidad, en los que se contaran entre 15 y 20 células TUNEL positivas y de mala calidad aquellos con un conteo mayor a 21 células apoptóticas.

Se utilizó un embrión de cada clasificación de ambos experimentos como controles negativos, a los cuales se les realizó todo el procedimiento



anteriormente mencionado exceptuando la incubación con el anticuerpo secundario (anti-mouse IgG Rodaminado) del kit para BrdU y la incubación con fluoresceína dTUP del TUNEL se realizó en ausencia de la enzima tdt.

El marcador Bromodeoxiuridin (BrdU) permite detectar la cadena de ADN durante la fase de síntesis y a su vez la fluoresceína-dUTP detecta la fragmentación del ADN durante el proceso de apoptosis. Los embriones fueron analizados para ambas fluorescencias con microscopio confocal LSM 5 pascal, Zeiss (Argon-Krypton laser), con filtro BP 450-490 y de esta manera realizar el conteo de los núcleos celulares en proliferación y en apoptosis. La fluorescencia para apoptosis da una coloración verde, mientras que para la proliferación da una coloración roja en el mismo embrión, sin embargo para hacer el conteo, se tomaron imágenes de cada técnica por separado.

### **6.3 Análisis estadístico**

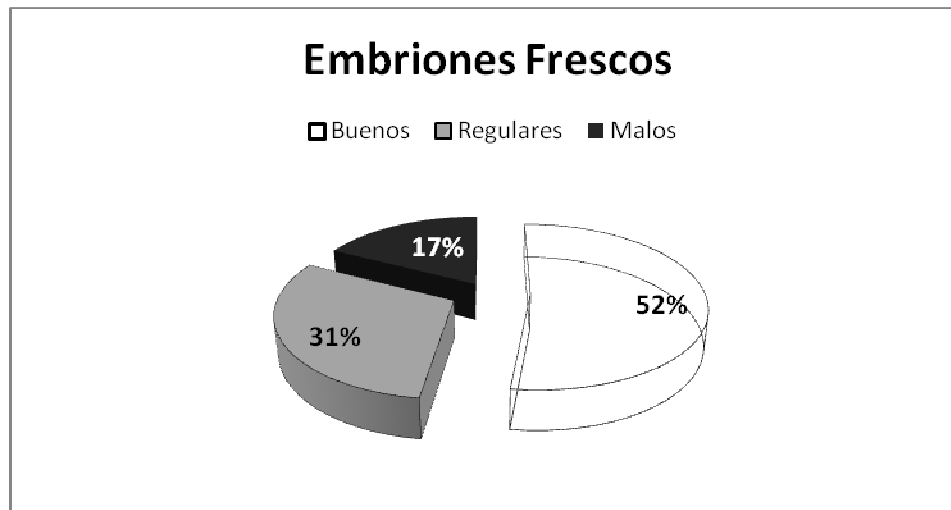
Los resultados obtenidos se analizaron por medio de estadística descriptiva. En cada categoría se calculó el porcentaje de embriones que se desarrollaron favorablemente en el cultivo así como el porcentaje de aquellos que mostraron características de degeneración. Además, se realizó un Análisis de Varianza con comparación de medias con el software estadístico SPSS 13.0 para comparar el promedio de núcleos apoptóticos y en proliferación del grupo experimental contra el grupo testigo en los experimentos 1 y 2. De la misma manera se realizó un Análisis de Varianza para comparar el promedio de núcleos TUNEL y BrdU positivos de los embriones frescos contra los congelados tanto de los grupos experimentales como los testigos con un nivel de confianza del 95%.

## VII. Resultados

### 7.1 Fase de campo

#### Producción de embriones en fresco

Se colectaron 46 embriones de 14 hembras que respondieron al tratamiento superovulatorio obteniéndose un promedio de 3.3 embriones por vaca, 24 de estos embriones fueron clasificados de buena calidad, 14 regulares y 8 malos (Gráfica 1).

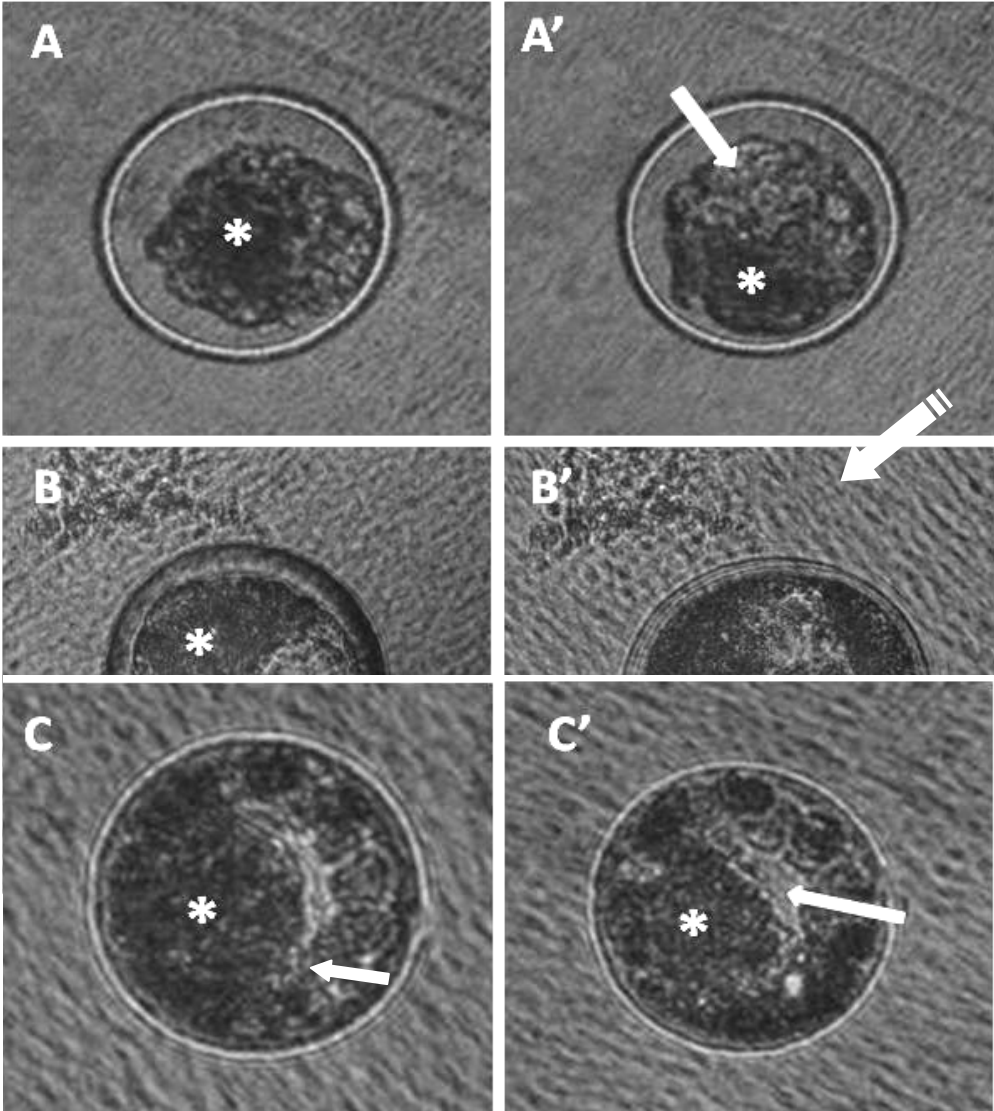


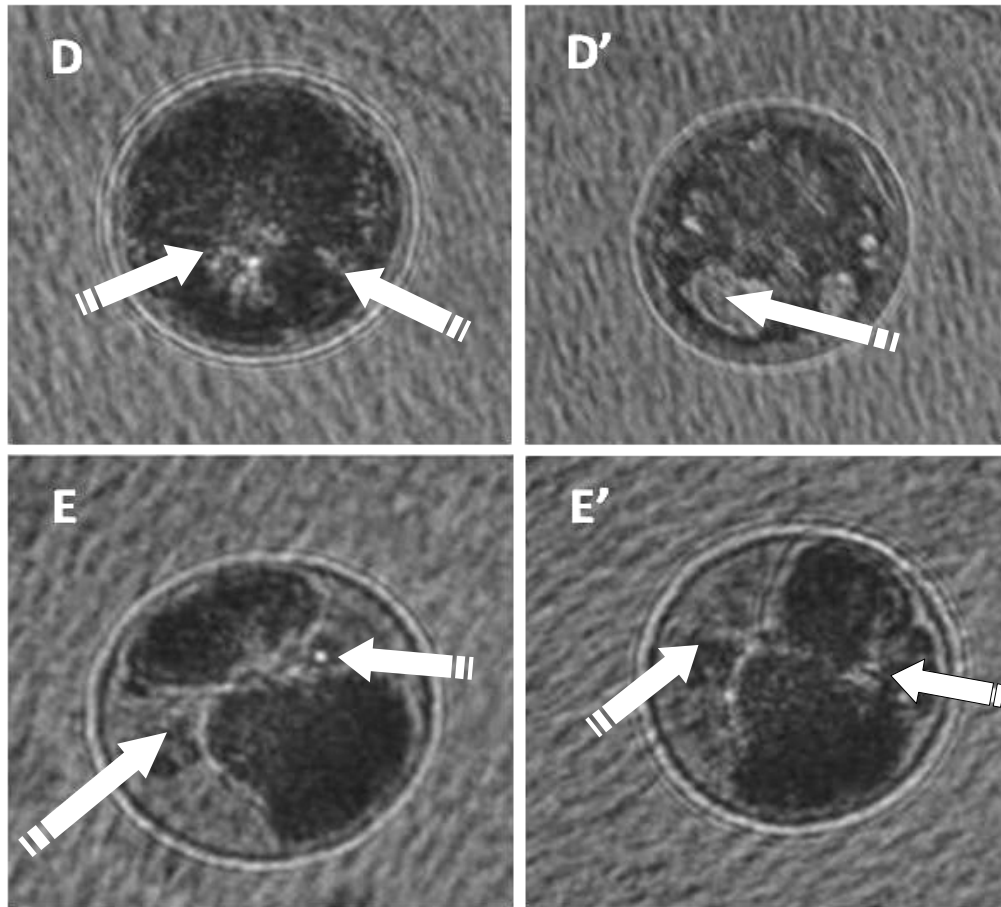
Gráfica 1. Porcentaje de embriones colectados en fresco y clasificados en tres categorías: Buenos, regulares y malos.

### 7.2 Evaluación durante el cultivo de embriones frescos

Durante las cuatro horas de cultivo a que se sometió el grupo experimental, se observó que el 74% de los embriones de buena calidad mantuvieron un desarrollo favorable, esto es que los blastómeros permanecieron compactos y de color uniforme, sin vesículas evidentes ni detritus celulares y la zona pelúcida no presentó daños; mientras que el 26% restante mostró cambios indicativos de degeneración como blastómeros extruídos, detritus celulares, formación de vesículas y daño en la zona pelúcida. En los embriones de regular calidad, 60%

mantuvieron un desarrollo favorable y el 40% presentaron cambios degenerativos concordantes con los mencionados anteriormente. En el caso de los embriones de mala calidad el 100% presentó cambios degenerativos durante el cultivo (Figura 2).





Figura

2.

Embriones F1 frescos al inicio del cultivo (**A**, **B**, **C**, **D** y **E**) y después de 4 horas (**A'**, **B'**, **C'**, **D'** y **E'**). Asterisco señalando la masa celular interna, flechas señalan el blastocele y flechas con bandas señalan vacuolas o detritus celulares.

**A)** Blastocisto temprano de buena calidad. Se distingue la masa celular interna MCI y la formación temprana del blastocele. **A')** Mismo embrión, 4 horas después del cultivo donde el blastocele continúa formándose y la MCI permanece intacta.

**B)** Blastocisto de buena calidad. Se distingue la MCI y el blastocele. **B')** Se observa un incremento en los detritus celulares.

**C)** Blastocito regular. Presenta algunas células de diferentes tamaños pero la MCI se encuentra íntegra y comienza la formación del blastocele. **C')** Continúa la formación del blastocele.

**D)** Mórula regular. Se observan algunas vesículas pequeñas. **D')** Incrementa la formación de vesículas de varios tamaños.

**E)** Embrión de mala calidad. Las flechas indican una gran proporción de detritus celulares los cuales se ven incrementados al final del cultivo (**E'**)

### Conteo de núcleos positivos a TUNEL Y BrdU

El conteo de núcleos positivos a TUNEL (núcleos en color verde) y positivos a BrdU (núcleos color rojo) se pueden observar en embriones de cada clasificación

fotografiados con el microscopio confocal a un aumento de 40x, en la figura 3. En los embriones de buena calidad (panel A) se puede observar que hay poca cantidad de núcleos TUNEL positivos (<14) y gran cantidad de núcleos positivos a BrdU. Mientras que en embriones de calidad regular (panel B) se aprecia un incremento en el número de núcleos TUNEL positivos (de 15 a 20) y una disminución de núcleos BrdU positivos. Finalmente en los embriones de mala calidad (panel C) se puede observar que los núcleos positivos a TUNEL (> 21) se encuentran en la mayor parte de la masa embrionaria y el número de núcleos positivos a BrdU ha disminuido considerablemente.

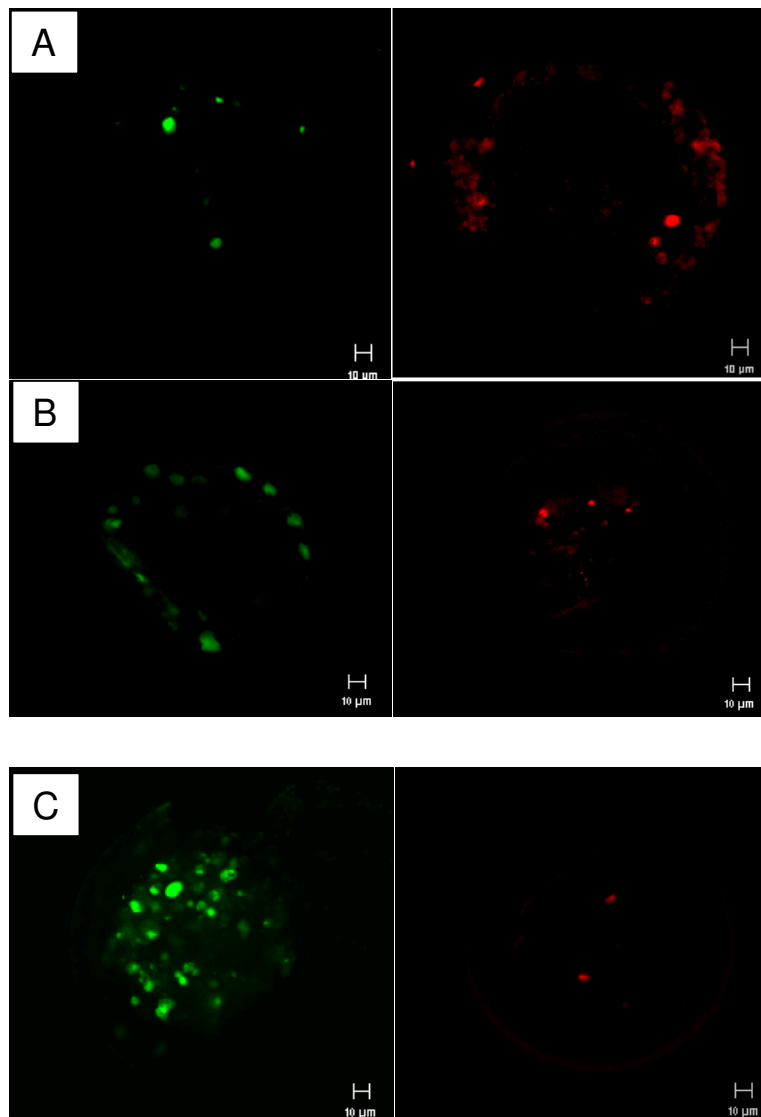


Figura 3. Embriones de cada clasificación mostrando los núcleos positivos a las pruebas de TUNEL (núcleos verdes) y BrdU (núcleos rojos). Donde se muestra un

embrión de buena calidad (panel A) uno regular (panel B) y uno de mala calidad (panel C)

Cuadro 2. Media  $\pm$  DE de núcleos positivos  
a TUNEL y BrdU en embriones frescos

	TUNEL		BrdU	
	Experimental	Testigo	Experimental	Testigo
Buenos	9.4 $\pm$ 6.8 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	14 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>
Regulares	16 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	18.8 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	9 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	4.4 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
Malos	30 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	27.5 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	7.7 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>

Literales diferentes en el mismo renglón y en la misma columna indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ )

En el cuadro 2 se puede observar que al comparar los embriones del grupo experimental contra el grupo testigo, no se encontraron diferencias estadísticas en la cantidad de núcleos positivos a TUNEL ni en la cantidad de núcleos positivos a BrdU para los embriones buenos, regulares y malos. En cambio, al comparar entre los grados de calidad, se encontró un incremento en el número de núcleos TUNEL positivos en los embriones malos, tanto en el grupo experimental como en el grupo testigo  $P < 0.05$

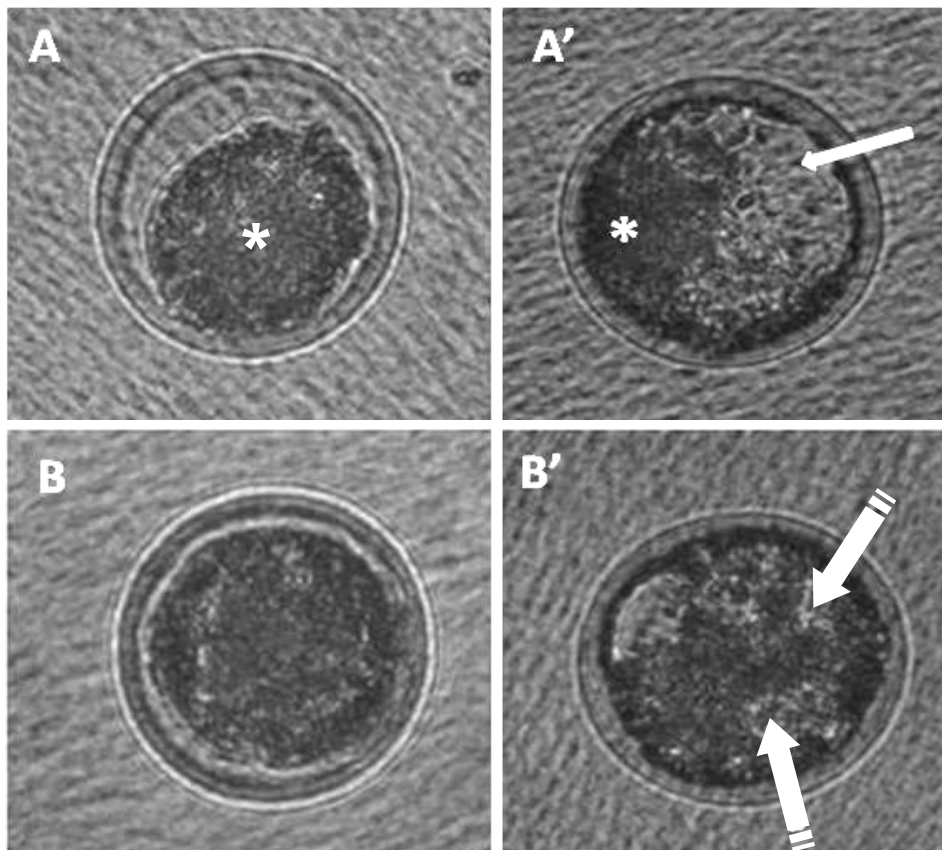
### 7.3 Embriones congelados

El grupo experimental 2 se formó con embriones congelados de los cuales 26 de ellos estaban clasificados como buenos y 21 como regulares.

### 7.4 Evaluación durante el cultivo de embriones congelados

De los embriones buenos, el 54% mantuvieron un desarrollo favorable durante las 4 horas de cultivo, esto es, que sus blastómeros mantuvieron una cohesión

adecuada, no presentaron daño en la zona pelúcida y se observó una mínima formación de detritus celulares o vesículas y en algunos casos pasaron del estadio que se encontraban hacia un más avanzado, mientras que el 46% mostró cambios que indican cierto grado de degeneración, principalmente se observó cambios en la coloración de los blastómeros, formación de vesículas y detritus celulares así como daños graves en la zona pelúcida. El 42% de los embriones de calidad regular presentaron las condiciones que muestran un desarrollo favorable las cuales fueron anteriormente descritas, mientras que el 58% de los embriones regulares mostraron características de degeneración (Figura 4). En este experimento no hubo casos de embriones de mala calidad ya que de manera general se congelan sólo embriones buenos y regulares.



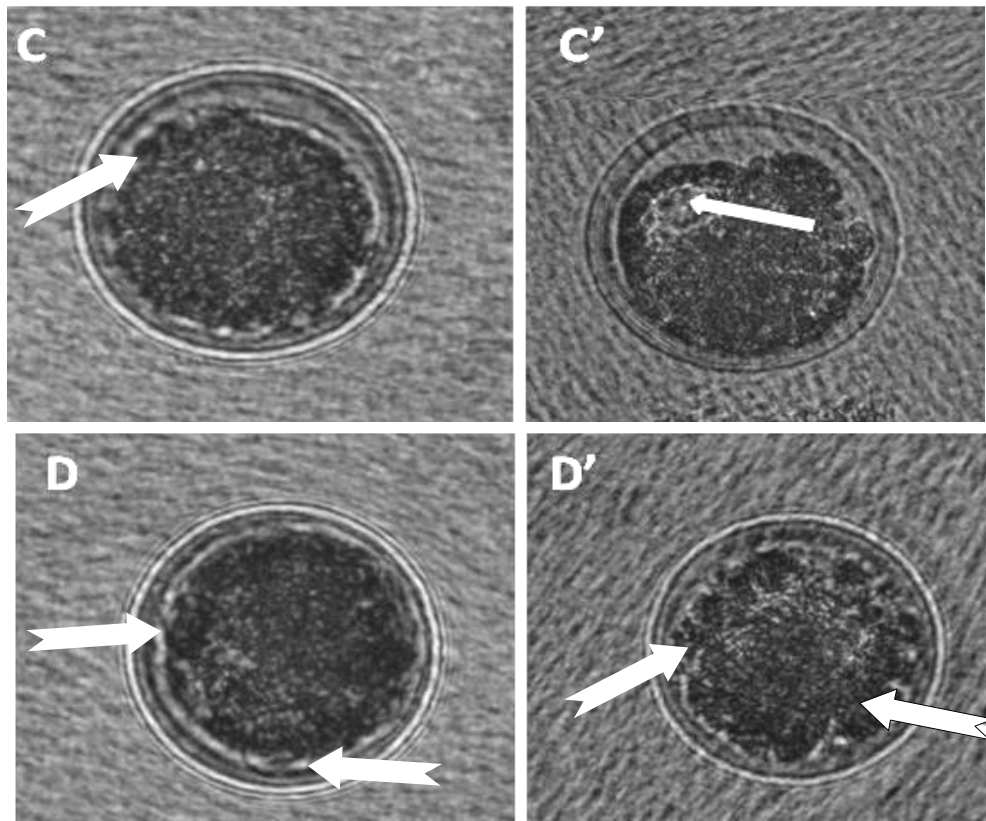


Figura 4. Embriones F1 criopreservados al inicio del cultivo (**A, B, C, D y E**) y después de 4 horas (**A', B', C', D' y E'**). Asterisco señalando la masa celular interna, flechas señalan el blastocele, flechas con muesca señalando blastómeros extruidos y flechas con bandas señalan vacuolas o detritus celulares.

**A)** Mórula de buena calidad. Se observa una masa celular homogénea y compacta. **A')** Al final del cultivo se observa un cambio de estadio a blastocisto.

**B)** Mórula buena. **B')** Las flechas indican la formación de vesículas de varios tamaños.

**C)** Mórula regular. Se observan algunos blastómeros extruidos. **C')** Se observa el comienzo de la formación del blastocele.

**D)** Mórula regular. **D')** Se observa un incremento en el número de blastómeros extruidos.

Cuadro 3. Media  $\pm$  DE de núcleos positivos a TUNEL y BrdU en embriones congelados

	TUNEL		BrdU	
	Experimental	Testigo	Experimental	Testigo
Buenos	14.1 $\pm$ 7.4a	13 $\pm$ 8.3a	4.2 $\pm$ 2.3b	2.1 $\pm$ 1.9b
Regulares	17.2 $\pm$ 8.9a	20.2 $\pm$ 9.2a	1 $\pm$ 2b	1.4 $\pm$ 1.4b

Literales diferentes en el mismo renglón indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ )



En el cuadro 3 se puede observar que no se encontraron diferencias significativas al comparar el número de núcleos positivos a TUNEL de los embriones del grupo experimental con los del grupo testigo, tampoco se encontraron diferencias al comparar el número de núcleos BrdU positivos entre el grupo experimental contra el grupo testigo ni al comparar los embriones buenos con los regulares.

## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que el 26% de los embriones buenos y el 40% de los regulares del experimento 1 (embriones frescos), así como el 46% de los embriones buenos y el 58% de los regulares del experimento 2 (embriones congelados) mostraron características indicativas de un embrión no viable, lo cual demuestra la importancia de realizar un cultivo corto para discriminar aquellos embriones que en la primer evaluación morfológica se consideran sanos pero que tiene pocas posibilidades de producir una gestación.

El 74% de los embriones buenos del experimento 1 (embriones frescos), mantuvieron características que indican un desarrollo favorable después de las 4 horas del cultivo, esto es que mantuvieron una cohesión adecuada entre los blastómeros, no hubo daño en la zona pelúcida y se observó una mínima formación de detritus celulares o vesículas, además de que un 10% pasaron del estadio en que se encontraban a uno más avanzado. De la misma manera, el 60% de los embriones regulares mantuvo un desarrollo con las características anteriormente descritas, las cuales son indicativas de un embrión saludable (Donnay 2002; Grisart *et al.*, 1994; Shoukir *et al.*, 1997; Merton *et al.*, 2003). Por otra parte, el 26% de los embriones buenos y el 40% de los regulares no se mantuvieron viables durante el cultivo, lo cual confirma lo mencionado por Rondeau y col., (1995) acerca de que existen embriones metabólicamente anormales, pero que en la evaluación morfológica parecen saludables. Este hallazgo puede explicar que en estudios realizados con embriones evaluados por microscopio estereoscópico donde se han reportado discrepancias alrededor del 30% para diferenciar los embriones regulares de los buenos (Aguilar *et al.*, 2002; Farin *et al.*, 1995). Esta dificultad confirma la subjetividad de la evaluación estereoscópica cuya base son las características morfológicas, ya que mientras algunos evaluadores pueden ser muy estrictos en sus criterios de selección otros no lo son y por lo tanto es necesario tener otros métodos o pruebas de fácil acceso que permitan observar el desempeño metabólico y así determinar su capacidad de desarrollo. En el presente trabajo, la implementación del cultivo

embrionario durante cuatro horas ayudó a diferenciar aquellos embriones clasificados de buena y regular calidad al microscopio estereoscópico, pero que tenían poca probabilidad de producir una gestación ya que en el medio de cultivo presentaron características indeseables.

En los estudios realizados por Romo y col., (2002) y Álvarez y col., (2004) quienes después de cultivar embriones de mala calidad durante 24 horas, al transferirlos obtuvieron 30% de gestación, los autores sugieren que el cultivo promueve la actividad mitótica e incrementa el número de células totales en los embriones de pobre calidad. Con los resultados observados en nuestro trabajo donde ningún embrión de mala calidad se desarrolló favorablemente, podemos pensar que efectivamente el microscopio empleado para la clasificación resulta muy subjetivo, ya que tal vez los embriones que llegaron a producir una preñez en los estudios citados anteriormente, no necesariamente eran de mala calidad. Otra posible explicación a estas diferencias, es que en los embriones de mala calidad el número de células en apoptosis sobrepasa la capacidad de regeneración y el medio de cultivo provee las condiciones para que el embrión exprese las características metabólicas *per se*, pero no las mejora. Finalmente, las discrepancias discutidas anteriormente también pudieron estar influenciadas por el número de embriones de esta clasificación utilizados en el presente trabajo (n=8) por lo que en este rubro se requerirá de un mayor número de embriones para trabajos futuros.

En cuanto al número promedio de núcleos en apoptosis encontrados en el presente estudio, éstos concuerdan con los trabajos de Márquez (2003) y Contreras y col., (2008), quienes encontraron para los embriones buenos un promedio menor a 14 núcleos apoptóticos, de 15 a 20 para los de calidad regular y más de 21 núcleos apoptóticos para los embriones malos. El número de núcleos positivos a BrdU no fueron tan consistentes como para determinar de manera precisa la capacidad de desarrollo en los embriones de bovino, esto puede deberse en primer lugar a que en las etapas tempranas del desarrollo, las células

de los embriones tienen un patrón de división asincrónico y por lo tanto no todas podrían encontrarse en la fase de síntesis al momento de la prueba (Gilbert 2005). Por otro lado, al ser una técnica que no ha sido desarrollada ni implementada de manera rutinaria en embriones, crea la necesidad de continuar perfeccionándola para lograr resultados que nos aproximen a conocer de manera más precisa la calidad y viabilidad de los embriones clasificados primariamente con el microscopio estereoscópico (Markkula *et al.*, 2001; Makarevich and Markkula 2002).

Al comparar los embriones del grupo experimental con los del grupo testigo, mediante la técnica de TUNEL-BrdU, no se encontraron diferencias estadísticas en ninguna clasificación, con esto se podría decir que el cultivo embrionario empleado para este trabajo, no necesariamente mejoró el desarrollo de los embriones, sino que únicamente les proporcionó las condiciones necesarias para que éstos expresen sus características metabólicas *per se*.

En el segundo experimento donde se utilizaron embriones congelados obtenidos de una fuente comercial, el 54% de los embriones buenos y el 42% de los regulares se mantuvo viable durante el cultivo, mientras que el 46% de los buenos y el 68% de los regulares mostraron cambios degenerativos a las 4 horas del cultivo. Estos resultados difieren con los encontrados por Contreras y col., (2008) donde el 100% de los embriones buenos y regulares se mantuvieron viables durante las primeras 8 horas de cultivo. Las diferencias pueden ser explicadas debido a que en el estudio anteriormente mencionado, los autores clasificaron, congelaron y mantuvieron en condiciones controladas el almacenamiento de los embriones durante 5 meses, a diferencia del presente estudio donde los criterios de clasificación, tiempo y condiciones de almacenamiento fueron desconocidos por los autores. Se sabe que la evaluación correcta de los embriones es el principal factor que afecta la tasa de preñez en los programas de transferencia de embriones (Cutini *et al.*, 2000; Lindner and Wrigth 1983; Hasler *et al.*, 1987; Hasler *et al.*, 1995; Reichenbach *et al.*, 1992) y que existe una gran variabilidad en los

criterios con los que son clasificados, principalmente cuando éstos provienen de razas cebuinas (Farin *et al.*, 1995; Aguilar *et al.*, 2002; López – Damián *et al.*, 2008). Por lo tanto, el pobre desempeño durante el cultivo de los embriones utilizados en este estudio, puede deberse en parte, a la subjetividad de realizar la evaluación morfológica como único criterio para seleccionar los embriones destinados a la congelación.

Por otro lado, el proceso mismo de congelación provoca daños celulares, diversos estudios han demostrado que los embriones son expuestos a niveles tóxicos de crioprotectores, además de ser sometidos a una reducción del volumen celular debido a la deshidratación osmótica y a la solidificación durante el enfriamiento (Dobrinsky 1996; Baguisi *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 1984). Por estas razones el congelamiento debe ser realizado con especial atención para reducir al mínimo los efectos dañinos. Finalmente, un manejo inadecuado o una pobre vigilancia del nivel de nitrógeno en los termos, puede comprometer la viabilidad de los embriones (Márquez *et al.*, 2004).

La criopreservación es una parte fundamental en la comercialización de los embriones, sin embargo no se tienen filtros para verificar la viabilidad de los mismos antes de ser transferidos a las receptoras. En este experimento se observó que el 46% y 58% de los embriones buenos y regulares respectivamente no se mantuvieron viables después de cuatro horas de cultivo, lo cual permite utilizar esta prueba para evaluar la capacidad de desarrollo en embriones descongelados y de esta manera tener un mejor control de calidad para transferir únicamente los embriones que muestren su potencial de desarrollo a través del cultivo.

La técnica TUNEL, ha demostrado ser una prueba bastante precisa en la detección de células apoptóticas y de esta manera confirmar la calidad de los embriones (Ikeda *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2004; Márquez *et al.*, 2005; Contreras *et al.*, 2008; Gutiérrez 2009). En el conteo de células apoptóticas entre

los grupos testigo y experimental en embriones tanto frescos como congelados, no se encontraron diferencias significativas, lo cual indica que el medio de cultivo empleado en el presente trabajo, no es un factor que altere la maquinaria metabólica del embrión, simplemente es un medio que le provee las condiciones para que éste exprese su potencial de desarrollo.

En cuanto a la aplicación de la técnica BrdU para determinar el número de blastómeros en proliferación, de las publicaciones accesibles no se encontraron datos donde se haya utilizado dicha técnica en embriones de bovino, sin embargo en estudios similares utilizando el Ioduro de Propidio y PCNA en embriones producidos *in vitro*, Markkula y col., (2001) y Makarevich and Markkula (2002) encontraron que existe una mayor proporción en la proliferación celular en embriones frescos que en los congelados. Para corroborar estos resultados se requerirá de mayor investigación al respecto.

La combinación de la técnica TUNEL – BrdU, es complementaria ya que hace posible visualizar tanto las células que se encuentran en apoptosis como las que se encuentran en fase de proliferación. Dicha técnica, aunque es invasiva, permite determinar con mayor certeza la viabilidad de los embriones, además de ser una alternativa novedosa para aplicarse en los embriones producidos y utilizados bajo condiciones tropicales. Debido a que la información encontrada en este rubro es escasa, se abre la posibilidad de plantear investigaciones subsecuentes para determinar la relación proliferación – apoptosis en los diferentes estadios del desarrollo embrionario, tanto en embriones que son producidos *in vivo*, como en aquellos producidos *in vitro*. De la misma manera, se puede aplicar dicha técnica para comparar embriones que son congelados por diferentes métodos (glicerol, etilenglicol, vitrificación) para determinar las variables que pudieran afectar su potencial de desarrollo después de ser descongelados.

En los embriones colectados en fresco se obtuvo un promedio de 3.3 embriones por vaca, los cuales son similares a los encontrados por Contreras y col., (2008),

Aguilar y col., (2002) y Márquez y col., (2005), donde se encontraron rangos entre 3 y 4 embriones transferibles por vaca en razas cebuinas, aunque algunos autores han reportado respuestas ligeramente superiores (entre 5 y 7 embriones transferibles por vaca), en la misma especie (Peixoto *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2009). Existen diversos factores que afectan la respuesta superovulatoria y el número de embriones transferibles, varios investigadores coinciden en que aquellos que son inherentes a la donadora son la edad, raza, estado nutricional, estado fisiológico y época del año (Kafi and McGowan 1997; Mapletoft 2002; Merton *et al.*, 2003; Chebel *et al.*, 2008).

En cuanto a la edad, varios estudios no han encontrado diferencias cuando las donadoras que se utilizan son menores de 9 años, pero cuando son mayores disminuye la respuesta superovulatoria, el porcentaje de embriones transferibles y su calidad, eso debido a que con el tiempo disminuye también el número de folículos capaces de responder al tratamiento superovulatorio (Lerner *et al.*, 1986; Kafi and Mc Gowan 1997; Mapletoft 2002; Pontes *et al.*, 2009). Efectivamente, en uno de los muestreos en el que utilizamos vacas mayores de 10 años ( $n = 10$ ) no fue posible obtener ningún embrión útil para este trabajo ya que del total de estructuras obtenidas ( $n = 14$ ,  $\bar{x} = 1.4$ ) el 21% fueron embriones viables, 22% fueron embriones con retardo en el desarrollo y el 57% restante se trató de ovocitos no fertilizados. La edad promedio de las hembras (menos de 9 años) de las cuales se produjo el total de embriones utilizados en nuestro estudio se encuentra dentro del rango sugerido por los autores anteriormente citados. Sin embargo, es necesario hacer más investigación sobre el efecto negativo de la edad sobre la producción de embriones, principalmente porque la mayoría de los ganaderos tienden a elegir los animales que han probado ser eficientes en su finca como donadoras antes de su sacrificio con la esperanza de tener un efecto multiplicador de éstos ejemplares los cuales son generalmente mayores de 10 años.

Con referencia a la raza, la fluctuación entre los estudios consultados es evidente. Así, Peixoto y col., en el 2006 encontraron un promedio de 7.3 embriones transferibles para la raza Brahman, de 4.1 para la Gyr, de 5.7 para la Guzerat y de 6.7 para la Nelore. Estos resultados difieren con los encontrados en el presente estudio (3.3 embriones transferibles por vaca) y con los descritos por Herrera Alvarez y col., (1987); Penna y col., (1998), quienes encontraron un promedio de 4 embriones viables por vaca. Varios autores han descrito la gran variabilidad en la respuesta superovulatoria de las razas cebuinas como uno de los principales retos a superar, (Baruselli 2006; Barros y Nogueira 2001; Nogueira *et al.*, 2002; Mapletoft 2002). La disparidad entre los resultados puede depender del potencial propio de la raza, del tipo y dosis total de FSH empleada y de la respuesta individual de los animales (Ake *et al.*, 1995), en este sentido existen estudios que muestran la susceptibilidad de las razas cebuinas a la acción de las gonadotropinas, lo que hace que en este ganado se empleen dosis menores de FSH (Visitin *et al.*, 1996; Baruselli 2003). Varios autores recomiendan utilizar una dosis total de 200 mg de FSH para lograr mejores resultados (D'Occhio *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2009). En nuestro estudio se utilizó una dosis total de 280 mg de FSH, ésta dosis se tendrá que ajustar en los tratamientos subsecuentes, además de elegir hembras que hayan tenido una respuesta favorable en un tratamiento superovulatorio previo, y por el contrario, no incluir aquellas vacas en las que la respuesta fue pobre o nula.

En cuanto a la alimentación, las vacas que se utilizaron en el presente estudio estuvieron sometidas a diferentes dietas propias de la explotación a la que pertenecían, por lo que no fue posible tener un estricto control sobre ésta variable. En este sentido tampoco fue posible mantener un seguimiento de los cambios de condición corporal de estos animales antes del tratamiento superovulatorio. Al respecto, Hanselmann (1995) citado por Becaluba (2007), encontró que la respuesta superovulatoria se correlaciona positivamente con la condición corporal, siendo el rango óptimo para implementar dicho tratamiento cuando la vaca se encuentra entre 3.0 y 3.5 (Hanselmann 1995). En nuestro trabajo, las hembras



donadoras utilizadas estuvieron dentro del rango óptimo sugerido (CC de 3.0). A pesar de ello, se obtuvo una respuesta pobre al tratamiento, posiblemente debido a que en el momento de la selección las hembras pudieron haber estado ganando o perdiendo peso. Por lo que se sugiere que en estudios para evaluar la respuesta superovulatoria se deba de tener un estricto control de los posibles cambios de condición corporal previa al tratamiento. Lo anterior puede ser confirmado con el estudio realizado por Siddiqui y col., (2002) donde vacas de ganado cebuino fueron sometidas a dos tipos de dietas durante tres meses antes de iniciar un protocolo de superovulación. En dicho estudio, se obtuvo una mejor respuesta con la dieta que mantuvo a las donadoras en un promedio de 3.0 en la condición corporal que con una dieta altamente nutritiva la cual ocasionó un aumento en la condición corporal de las hembras donadoras hasta un máximo de 4.5. Lo anterior sugiere la necesidad de implementar un régimen de suplementación que sea adecuado a los requerimientos de la raza y principalmente que proporcione de manera eficiente los nutrientes que pueden afectar la respuesta superovulatoria (Santos *et al.*, 2008; Benyei *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2009).

Por otro lado, el promedio de 3.3 embriones transferibles por vaca obtenido en nuestro trabajo puede explicarse en base a múltiples estudios, los cuales demuestran que las donadoras *Bos indicus* reclutan una mayor cantidad de folículos por oleada, sin embargo el diámetro que éstos alcanzan antes de ovular es menor que en hembras *Bos taurus* siendo de 11 mm y 16 mm respectivamente lo cual puede ser la causa de encontrar un gran número de ovocitos no fertilizados al momento de la colecta (Bo *et al.*, 2003; Baruselli *et al.*, 2006; Sartorelli 2005; Figueiredo *et al.*, 1997; Pontes *et al.*, 2009). Debido a las condiciones experimentales de nuestro trabajo no fue posible medir el diámetro de los folículos de los animales utilizados, por lo que en futuras intervenciones será necesario prestar especial atención a esta variable.

Además, la época del año en que se realizan los tratamientos de superovulación y transferencia de embriones, tiene una influencia en la respuesta ovárica así como

en la calidad de los embriones colectados, los cuales se ven más afectados en el verano que en el invierno (Márquez *et al.*, 2005, Chebel *et al.*, 2008;). Si bien, la influencia de la época del año sobre el número y la calidad de los embriones no fue objetivo del presente estudio, se encontró que en la colecta del verano se recuperó el 41% del total de embriones, de los cuales el 52% se clasificaron de buena calidad, 26% como regulares y el 21% como embriones malos. Así mismo, en el invierno se obtuvo el 58% del total de embriones producidos, siendo el 66% embriones buenos, 26% regulares y el 7% malos. Estos hallazgos indican la importancia de tomar en cuenta la época del año en la que se realizará el tratamiento de superovulación y colecta de embriones, ya que en climas tropicales los meses calurosos registran temperaturas ambientales de 38 hasta 44° C (Kafi and McGowan 1997; Barati *et al.*, 2006; Wolfenson *et al.*, 2000). La alta temperaturas, la humedad y la radiación solar disminuyen el consumo de alimento y por ende la eficiencia reproductiva de la vaca (Roman 1981), de manera directa durante el verano los embriones son expuestos a la temperatura corporal de la madre que llega a alcanzar los 39.7°C lo cual afecta la viabilidad de los embriones en estadio de mórula y blastocisto (Gwazdauskas 1985; Zakari *et al.*, 1981). En hembras que han sido sometidas a estrés térmico, se ha encontrado que incrementa de manera significativa el número de embriones degenerados o con retardo en el desarrollo a los 7 días post inseminación (Putney *et al.*, 1988, Putney *et al.*, 1989; Chebel *et al.*, 2008; Sugiyama *et al.*, 2003).

Por lo tanto se puede concluir que para obtener mejores resultados en los programas de superovulación y transferencia de embriones bajo condiciones tropicales, se debe considerar que las hembras que se seleccionen como donadoras sean menores de 9 años, que hayan tenido una respuesta satisfactoria a un tratamiento previo, que se lleve un adecuado control de la dieta, la cual proporcione los nutrientes requeridos para que las donadoras se encuentren en un rango de 2.5 a 3.5 de condición corporal al momento del tratamiento superovulatorio y que la implementación del protocolo se lleve a cabo en la época del año cuando la temperatura ambiental no sea elevada.

## IX. CONCLUSIONES

El acercamiento experimental utilizado en el presente estudio permite concluir lo siguiente:

- Con la aplicación de tecnologías como el cultivo embrionario es posible tener una mejor evaluación de los embriones tanto frescos como congelados. Así mismo, es una herramienta útil para evaluar embriones provenientes de fuentes comerciales, o que se encuentran almacenados por tiempos prolongados.
- Con las técnicas invasivas como TUNEL – BrdU, es posible tener una mejor comprensión de la capacidad de desarrollo del embrión, si bien dichas técnicas no son aplicables a los embriones destinados a la transferencia, son muy útiles en la generación del conocimiento que permita plantear nuevas estrategias para hacer de la ganadería una práctica rentable y eficiente.
- Para disminuir la variabilidad registrada en cuanto a la calidad y el número de embriones recuperados en los tratamientos de ovulación múltiple en vacas *Bos indicus*, es necesario tener un adecuado control de las variables que influyen de manera negativa sobre la respuesta superovulatoria.

## X. LITERATURA CITADA

**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.

**Aguilar MM**, Galina CS, Merchant H, Montiel F, Canseco R, Márquez YC. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 2002; 37: 341-346

**Ake LJ**, Alfaro GM, Holy L. Respuesta superovulatoria en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones tropicales, y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Vet. Mex.* 1995; 26: 189-193

**Alarcón Zapata MA**. Viabilidad biológica y económica de la aplicación de la transferencia de embriones con productores del estado de Tabasco. Tesis de maestría. FMVZ-UNAM, México. 2008

**Alberts**. Biología molecular de la célula. Barcelona: Omega. 2004.

**Alvarez RH**, Pires RML, Martínez AC, Meneghel M, Meirelles FV. Desenvolvimento *in vitro* de embriones bovinos de má qualidade submetidos a tres diferentes meios de cultura. *Act. Sci. Vet.* 2004; 32:42

**Alvarez RH**, Meneghel M, Martinez AC, Pires RML, Schammas EA. Transfer of bovine blastocysts derived from short-term *in vitro* culture of low quality morulae produced *in vivo*. [Reprod. Dom. Anim.](#) 2008; 43: 257-260

**Ávila CMC**. Apoptosis y riñón. *Rev Fac Med UNAM.* 2000; 43: 12-15

**Baguisi A**, Lonergan P, Overstrom E, Boland M. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology.* 2000; 55:162

**Barati F**, Niasari-Naslaji A, Bolourchi M, Sarhaddi F, Razavi K, Naghzali E, Thatcher WW. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology.* 2006; 66: 1149-1155

**Barros CM** and Nogueira MFG. Embryo Transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2001; 56:1463-1496

**Barros CM**, Pegorer MF, Vasconcelos JL, Eberhardt BG, Monteiro FM. Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. *Theriogenology*. 2006. 65:210-218

**Baruselli PS**, Filho MFS, Martins CM a, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bo GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006; 65: 77–88

**Baruselli PS**, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bó GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006; 65: 77-88

**Baruselli PS**, Marques MO, Reis EL, Nasser LFT, Silva RCP, Menegatti JA, et al. Adequação da dose de FSH (Folotropin-V) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. *Acta. Sci. Vet.* 2003; 31: 244–245.

**Becaluba F**. Factores que afectan la superovulación en bovino. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar>

**Bényei B**, Komlósi I, Pécsi A, Pollott G, Marcos CH, De Oliveira Campos A, Lemes MP. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 93:268-279

**Bényei B**, Gáspárdy A, Barros CW. Changes in embryo production results and ovarian recrudescence during the acclimatisation to the semiarid tropics of embryo donor Holstein-Friesian cows raised in a temperate climate. *Anim Reprod Sci.* 2001 Oct 31;68(1-2):57-68

**Bhojwani S**, Tomek W, Jonas L, Becker F, Alm H, Torner H, Kanitz W, Poehland R. Ultrastructural analysis reveals striking differences of intercellular contact lengths in bovine embryos produced in vivo, in vitro and by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev.* 2007; 74: 775-784.

**Blow J**, Tanaka T. [The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. Second in the cycles review series.](#) EMBO Reports. 2005; 6: 1028–1034

**Bo GA**, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. Anim. Reprod. Sci. 2003; 78:307-26

**Botticelli AR**, [Casali AM](#), [Botticelli L](#), [Zaffe D](#). [Immunohistochemical detection of cell-cycle associated markers on paraffin embedded and formalin fixed needle biopsies of prostate cancer: correlation of p120 protein expression with AgNOR, PCNA/cyclin, Ki-67/MIB1 proliferation-scores and Gleason gradings.](#) Eur. J. Histochem. 1998; 42: 41-48

**Brandao DO**, Maddox-Hyttel P, Lovendahl P, Rumpf R, Stringfellow D, Callensen H. Post hatching development: a novel system for extended *in vitro* culture of bovine embryos. Biol. Reprod. 2004, 71: 2048:2055

**Byrne AT**, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of the apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. J Reprod Fertil, 1999, 117: 97-105

**Cabrera P**, Fernandez A, Bastidas P, Perozo E, Molina M, Bethencourt A, Vivas I, Reyes Y, Díaz T. Efecto del peso de la donadora sobre la tasa de colecta de embriones murinos (*Mus musculus*). Zootecnia. Trop. 2009; 27: 73-77

**Celestinos A**, Sánchez R. Muerte celular programada o apoptosis: significado biológico y diagnóstico durante el desarrollo embrionario. Tecno. Vet. 2002: 8

**Chebel RC**, Demétrio DGB, Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. Theriogenology. 2008; 69: 98- 106

**Cheville N.F.** Introducción a la Patología Veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza, 1989

**Contreras DA**, Galina CS, Avila JG, Aspron MP, Moreno-Mendoza N. A system to evaluate the quality of frozen embryos through short-term culture. Anim. Reprod. Sci. 2008; 106: 369–379

**Contreras DA.** Sistema de cultivo de embriones bovinos "F1" para juzgar su viabilidad. Tesis de Maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (2006).

**Cunningham E.** The genetic improvement of cattle in developing countries. *Theriogenology*. 1989; 31:17-28

**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

**D'Occhio MJ,** Sudha G, Jillella D, Whyte T, Maclellan LJ, Walsh J, Trigg TE, Miller D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology*. 1997; 47: 601- 613

**Dobrinsky JR,** Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of normal piglets after cytoskeletal stabilization of embryos and cryopreservation by vitrification. *Theriogenology*. 1997; 49: 345

**Dobrinsky JR.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*. 1996; 45: 17-26

**Donnay I,** Feugang JM, Bernard S, Marchandise J, Pampfer S, Moens A, Dessy F. Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of *in vitro* produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. *Zygote*. 2002; 10: 189-199

**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

**Elmore S.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516

**Elsden LD** and Seidel GE. In: Evaluation of embryos. Procedures for recovery, bisection, freezing and transfer of bovine embryos. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Colorado State University. 1990: 13-16

**Fahy GD,** MAac Farlene C, Angell H, Meryman. Vitrification as an approach to cryoconservation. *Cryobiology*. 1984; 21: 407-426

**Farin CE**, Hasler JF, Martus NS and Stokes JE. A comparison of menezó's comparison of menezó's B2 and tissue culture medium-199 for *in vitro* production of bovine blastocysts. *Theriogenology*. 1997; 48:699-709

**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

**Figueiredo RA**, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*). *Theriogenology*. 1997; 47: 1489–505

**Galli C**, Duchi R, Crotti G, Turini N, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59:599-616

**Gardner DK**. Changes in the requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*. 1998; 49:83-102.

**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: 493- 501

**Gilbert SF**. Desarrollo temprano en los vertebrados: peces, aves y mamíferos. En: *Biología del desarrollo*. Editorial Médica Panamericana. 2005

**Gjørret JO**, Knijn HM, Dieleman SJ, et al. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod* 2003, 69:1193-M1200

**Goto K**, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1988; 83:753-758

**Gratzner HG**. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 1982; 218: 474-475.

**Grisart B**, Massip A and Dessy F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J. Reprod. Fertility.* 1994; 101: 257-264



**Gutiérrez C**, Cifuentes E, Pérez R, Romero L, Martínez N, Gonzáles M. Transferencia de embriones fecundados *in vitro* en ganado de doble propósito. Revista MVZ Córdoba. 2001; 6: 52-57

**Gutiérrez M**. Estudio comparativo sobre dos sistemas de evaluación (microscopio estereoscópico e invertido de contraste de fases) en embriones de ganado *Bos indicus*. Tesis de Maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (2009).

**Gwazdauskas FC**. Effects of Climate on Reproduction in Cattle. J Dairy Sci. 1985; 68: 1568-1578

**Hardy K**. Cell death in the mammalian blastocyst. Mole. Hum. Reprod. 1997; 3: 919-925

**Hasler JF**, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Mc Cauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JA, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology. 1995; 43: 141-152.

**Hasler JF**, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology. 1995; 43: 141-152

**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**. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. J. Dairy. Sci. 1992; 75: 2857-2879

**Hasler JF**. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology. 2001; 56:1401-1415

**Heron MI** and Rakusan K. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) detection of cellular proliferation in hypothyroid and hyperthyroid rat hearts. J. Mol. Cell. Cardiol. 1995; 97: 1393- 1403

**Herrera Alvarez R**, Aguiar AF, de Strassburguer J. Indução da superovulação com FSH-p ou hMG em gado Nelore. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 1987; 11: 187–191

**Ikeda S**, Prendes JM, Alonso-Montes C, Rodríguez 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

**Jacokowsky S**, Leibo SP, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. J. Exp. Zool. 1980; 212: 329- 341

**Juriscova A**, [Varmuza S](#), [Casper RF](#). Programmed cell death and human embryo fragmentation. [Mol Hum Reprod](#). 1996; 2: 93-98

**Kafi M**, McGowan M. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. Anim. Reprod. Sci. 1997, 48: 137-157

**Krisher RL**, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. Theriogenology. 1998; 49:103-114.

**Kumar V**, Cotran RS y Robbins SL. Patología humana. 6ª ed. ED. McGraw-Hill-Interamericana 1997.

**Lane M**, Gardner DK. Embryo cultura médium: wich is the best?. Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2006; 21: 83- 100

**Lane M**, Gardner DK. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. Biol. Reprod. 2000; 62:16-22

**Lardelli P**, [Perentes E](#), [Meier G](#), [Navarro N](#), [Ettlin RA](#). Quantification of hepatocytic proliferation in the laboratory mouse. A comparative study using immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression. Exp. Toxicol. Pathol. 1994; 46: 95-100

**Larocca CE** y Fernández TA. Congelación de embriones bovinos con etilenglicol vs glicerol. Arch. Zootec. 1997; 46: 295-300

**Lerner SP**, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK, Dailey RA, Lewis PE, Butcher RL. Age of dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. J. Anim. Sci. 1986; 63: 176- 183

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

**Lodish**. Biología celular y molecular. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2005 [ISBN 950-06-1974-3](#).

**López-Damián EP**, Galina CS, Merchant H, Cedillo-Peláez C, Aspron M. Assessment of *Bos taurus* embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy. J. Cell Animal Biology. 2008; 2: 72-78

**Madalena F**, Teodoro R, Lemos J, Montiero Y, Barbosa T. Evaluation of strategies for crossbreeding of dairy cattle in Brazil. J. Dairy. Science. 1989; 73:1887-1901

**Majno G** and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. Amer. J. Path. 1995; 146:3-15.

**Makarevich AV** and Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. Biol. Reprod. 2002; 66: 386–392

**Mapletoft RJ**, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. Reprod. Nutr. Dev. 2002; 42: 601-11.

**Markkula M**, Rätty M, Jauhiainen L, Paranko J, Raula J, Makarevich A. Ratio of proliferating cell nuclear antigen positive nuclei to total cell number is higher in Day 7 than in Day 8 vitrified *in vitro* produced bovine embryos. Biol. Reprod. 2001; 65:52–59

**Márquez AYC**, Galina CS, Castilla B, León H, Moreno-Mendoza N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the tunel technique. Reprod. Dom. Animals. 2004; 39: 141-145

**Márquez AYC**. Utilización de la técnica de transferencia de embriones para evaluar la estacionalidad reproductiva en ganado cebú. Tesis de Doctorado Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (2003).

**Marquez YC**, Galina CS, Moreno N, Ruiz H, Merchant H. Seasonal effect on Zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. Reprod. Dom. Animals. 2005; 40: 553-558

**Márquez YC**, Galina CS, Moreno N, Ruiz H, Ruiz A, Merchant L. Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reprod Dom Anim*, 2005, 40: 553-558

**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

**Matwee C**, Betts D, King W. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zigote*. 2000; 8: 57-68

**Menezo YJR**, CJ Khatchadourian. The laboratory culture media. *Assist. Reprod. Rev.* 1991; 6,136-143

**Merton JS**, De Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 2003; 59: 651-74

**Merton JS**, De Roos APW, Mullaart R, De Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 2003; 59: 651- 674

**Monforte DC**. Congelación de embriones bovinos producidos *in vitro*. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Centro de Selección y Reproducción Animal. Gijón (Asturias). 2003

**Monteiro FM**, Ferreira MMG, Potiens JR, Eberhardt BG, Trinca LA, Barros CM. Influence of Superovulatory Protocols on *In Vitro* Production of Nellore (*Bos indicus*) Embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 2009

**Nogueira MFG**, Barros BJP, Teixeira AB, Trinca LA, D'Occhio MJ, Barros CM. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*. 2002; 57: 1625–34

**Occhio M**, Jillella D, Lindsey B. Factors that influence the recruitment, growth and ovulation during ovarian superestimulation 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.

**Palasz AT.** Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. En: IIº [Simposio](#) Internacional de [Reproducción](#) Animal. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. Argentina. 1996; 185-94

**Palma GA.** Evaluación morfológica de los embriones bovinos. En GA Palma y G Brem. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 2ª Edición 2008

**Paniagua R,** Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, José Sáez F. Citología e histología vegetal y animal. McGraw-Hill Interamericana de España. 2002

**Peixoto MGCD,** Bergmann JAG, Fonseca CG, Penna VM, Pereira CS. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2006; 58: 567- 574

**Penna VM,** Madalena FE, Alvim MTT. Open nucleus in Guzera. In: World congress on genetics applied to livestock production. 1998; 6: 439

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

**Peres LC,** Pincinato D, Cutaia L, Bo GA. Simplificación de los programas de transferencia de embriones a tiempo fijo en rodeos comerciales. Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción en bovino. IRAC. 2006

**Pollard JW** and Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*. 1994; 41: 101-106

**Pontes JHF,** Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, TRR Barreiros, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*. 2009; 71: 690–697

**Putney DJ**, Drost M, Thatcher WW. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*. 1989; 31:765–776.

**Putney DJ**, Thatcher WW, Drost M, Wright JM., DeLorenzo MA. Influence of environmental temperature on reproductive performance of embryo donors and recipients in the southwest region of United States. *Theriogenology*. 1988; 30: 905–922.

**Rall WF**, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrificación. *Nature*. 1985; 313: 573- 575

**Reichenbach HD**, Liebrich J, Berg U, Brem G. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Rep. Fertiliz.* 1992; 95: 363-370

**Reichenbach HD**. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. *Act. Sci. Vet.* 2003; 31: 28- 50

**Reiger D**, Loskutoff NM, Betteridge KJ. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 1992; 95: 585-595

**Rizos D**, Ward F, Duffy P, Boland MP, and Lonergan P. Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development *In Vitro* Versus *In Vivo*: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. *Mol. Reprod. Develop.* 2002; 61:234- 248

**Roa N**, Linares T, Barrios D, Tamasaukas R, De Rolo M. Respuesta reproductiva de novillas mestizas (*Bos indicus* x *Bos taurus*) usadas como receptoras de embriones bovinos en el trópico venezolano. II Selección de novillas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 1997; 5: 409-411

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

**Román PH**. Potencial de producción de los bovinos en el trópico de México. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. SARH. 1981

**Romo S**, Ducolomb YC, Oden J, Wier LM, Wright JM, Kraemer DC. .  
Theriogenology. 2002; 57: 526

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

**Santos JE**, Cerri RL, Sartori R. Nutritional management of the donor cow. Theriogenology. 2008; 69: 88-97

**Sartorelli E**, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. Theriogenology. 2005; 63: 2382– 2394

**Schneider U** and Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. Theriogenology, 1984, 21:68-79

**Schneider U**, Mazur P, Leibo SP. The permeability of day 7 bovine embryos to DMSO or glycerol. Cryobiology. 1983; 20: 741

**Shoukir Y**, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. Hum. Reprod. 1997; 12: 1531-6.

**Siddiqui MAR**, Shamsuddin M, Bhuiyan MMU, Akbar MA, Kamaruddin KM. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. Reprod. Dom. Anim. 2002; 37: 37-41

**Sommerfeld V** and Niemann H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. Cryobiology. 1999; 38: 95-105

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

**Sugiyama S**, McGowan M, Kafi M, Phillips N, Young M. Effects of increased ambient temperature on the development of *in vitro* derived bovine zygotes. Theriogenology. 2003; 60: 1039–1047

**Thompson JG**, Cox S, McGowan LT, Tervit, HR. Development and metabolic activity of bovine *in vitro*-produced blastocyst, cultured in the presence of 2,4-dinitrophenol during compaction and blastulation. *Theriogenology*. 2000; 53: 303

**Thompson JG**. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 1996, 45:27-40

**Van Wagtendonk-De Leeuw AM**, Den Daas JHG, Kruij THAM, Rall WF. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology*, 1995, 32:157-167

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

**Viuff D**, Rickords L, Offenberd H. A high proportion of bovine blastocyst produced *in vitro* are mixoploid. *Biol. Reproduction*. 1999; 60: 1273-1278

**Vivanco WH**. Development and application of ovum pick up (OPU) and *in vitro* embryo production in the bovine. A review to artech experiences. In: *Proceedings of the Australian Embryo Transfer Society*. 2000; 29- 48

**Whittingham DG**. Principles of embryo preservation. In: *Low temperature preservation in medicine and biology*. (MD Ashwood-Smith and J Farrant Eds.). Pitman Medical, Tunbridge Wells. 1980: 65-83

**Wolfenson D**, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci*. 2000; 60/61: 535-547

**Wurth YA**, Reinders JMC, Rall WF, Kruij AM. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single embryo transfer. *Theriogenology*. 1994; 42: 1275-1284.

**Wyllie AH**, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol*. 1980, 68: 251-306.

**Yang MY** and Rajarnabendran R. Involvement of apoptosis in bovine blastocyst produced *in vitro*. *Theriogenology*. 1999, 51; 1: 336



**Yu CC**, Woods AL, Levison DA. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem. J.* 1992; 24: 121-131

**Zakari AY**, Molokwu ECI, Osori DIK. Effects of rectal and ambient temperatures and humidity on conception rates. *Theriogenology.* 1981; 16:331