



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CLASIFICACION Y EVALUACION DE EMBRIONES
BOVINOS EN LA TECNICA DE TRANSPLANTE
DE EMBRIONES

T E S I S

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

BERTHA ODILLE ROMO BELIN

ASESORES:

ALEJANDRO PARRA CARRETERO

RICARDO NAVARRO FIERRO

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Pag .

CONTENIDO

RESUMEN	V
INTRODUCCION	1
HISTORIA	3
ANTECEDENTES SOBRE CLASIF. DE EMBRIONES ..	5
DESARROLLO EMBRIONARIO	8
OBJETIVO	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS Y DISCUSION	22
CONCLUSIONES	33
LITERATURA CITADA	34

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
1.- DESARROLLO EMBRIONARIO	9
2.- FACTORES QUE AFECTAN LA IMPLANTACION EMBRIONARIA	12
3.- CARACTERISTICAS PARA LA EVALUACION Y CLASIFICACION DE EMBRIONES BOVINOS	23

INDICE DE CUADROS

1.- CLASIFICACION Y EVALUACION DE LOS EMBRIONES RECOLECTADOS EN LOS 86 TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACION.	25
2.- NUMERO DE EMBRIONES Y GESTACIONES OBTENIDAS DE ACUERDO A: RAZA, TIPO Y CALIDAD	28
3.- PORCENTAJE DE ANIDACION POR RAZA DE LA DONADORA	29
4.- NUMERO DE EMBRIONES TRANSPLANTADOS Y GESTACIONES LOGRADAS DE ACUERDO A LA EDAD DE ESTOS Y A LA SINCRONIZACION DONADORA RECEPTORA	30
5.- PORCENTAJE DE PREÑEZ DESPUES DE LA TRANSFERENCIA	33

EVALUACION Y CLASIFICACION DE EMBRIONES BOVINOS EN LA TECNICA DE TRANSPLANTE DE EMBRIONES.

Bertha Odille Romo Belin.
ASESORES: Alejandro Parra Carretero.
Ricardo Navarro Fierro.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue clasificar de acuerdo al estado de desarrollo, y evaluar por calidad morfológica los embriones recolectados para transferencia, y con base en esto, determinar cuales son más viables. Se utilizaron 20 vacas raza Charolais, 15 Salers, 9 Criollo, 4 Cebú y 2 Simental como donadoras y 300 vacas de diferente composición genética como receptoras. La recolección se llevó a cabo mediante la técnica no quirúrgica. El implante del embrión se realizó por una incisión a través del flanco correspondiente al ovario con cuerpo lúteo.

Los embriones obtenidos se clasificaron en: 1) no fecundados (NF), 2) degenerados (D), 3) embriones jóvenes (EJ), 4) mórulas (M), 5) blástulas (B) y 6) blastocistos expandidos (BE). Del 3o. al 6o. grupo se evaluaron como: a) normales (N), y b) en proceso de degeneración (EPD).

Se realizaron 86 tratamientos de superovulación, obteniéndose 108 NF, 13 D, 20 Ej, 48 M, 60 B, y 31 BE. De estos se transplantaron 11 EJ, evaluados como N, y 1 EPD; 30 M,N y 18 EPD; 30 BE,N y 0 EPD.

Se detectaron receptoras gestantes por: 14 mórulas normales (46.66%) y 3 en proceso de degeneración (16.66%), 19 blástulas normales (37.25%) y 1 en proceso de degeneración (100%) y 11 blastocistos expandidos normales (36.66%). El análisis estadístico indicó una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de implantación de embriones jóvenes con respecto a mórulas, blástulas y blastocistos expandidos.

La evaluación morfológica dentro de cada una de las clasificaciones de mórulas, resultando altamente significativa ($P < 0.001$). La estimación de esta diferencia señala que las mórulas normales tienen probabilidad de continuar la gestación 29.23% mayor que los clasificados en proceso de degeneración.

En cuanto a la raza de la donadora, las vacas Criollo y Simental dieron una respuesta muy pobre al tratamiento de superovulación. Se observó gran diferencia en la tasa de preñez por raza entre las hembras Charolais (31.46%), Salers (43.58% y Cebú (9.0%), sin embargo la diferencia entre razas no es significativa ($P < 0.1$)

INTRODUCCION.

La gestación en las vacas dura un poco más de 9 meses, naciendo una cría por vaca, en la mayoría de las veces. Esto por la característica monotoca de la vaca, es decir de liberar un solo óvulo al final de cada estro.

El bajo índice de concepción y el largo intervalo entre generaciones ha limitado el aumento del número de animales, y con esto la producción de carne suficiente para cubrir las necesidades alimenticias del hombre. Al mismo tiempo se toman muchos años para recuperar las cabezas perdidas por epidemias u otras causas, lo cual ha hecho pensar en la necesidad de buscar nuevos métodos que permitan aumentar la productividad y la eficiencia del ganado.

Las nuevas técnicas reproductivas como la transferencia de embriones y la inducción de ovulaciones múltiples por medios hormonales, permiten el mejoramiento genético del ganado en periodos más cortos y el aumento en la producción de leche y carne.

La transferencia de embriones es una de las técnicas más recientes en la reproducción animal, la cual puede ser de gran ayuda para el criador y el productor de ganado bovino en sus esfuerzos para mejorar la cantidad, calidad y eficiencia --

reproductiva y productiva del pie de cría.

Hasta hace poco tiempo, el mayor aprovechamiento de la capacidad genética de los bovinos se limitaba únicamente al torom por medio de la inseminación artificial; sin embargo ahora, con el método de trasplante de embriones, se puede aprovechar más intensamente la capacidad reproductora de la vaca, pues si en condiciones normales se obtiene una sola cría cada 12 ó 14 meses por el método de trasplante de embriones se pueden conseguir hasta 40 crías en un año, las cuales cumplen su gestación en vacas nodrizas de inferior calidad.

Los trasplantes de embriones en bovinos están reforzando en México los programas de mejoramiento genético que realizan los centros de inseminación y reproducción animal, lo que resulta de gran importancia, sobre todo si tomamos en cuenta las grandes diferencias que existen en la calidad de nuestros ganados, ya que más de la mitad de la población bovina corresponde a ganado criollo de baja productividad.

El procedimiento incrementa la reproducción de la hembra, no solo en cuanto a un mayor número de crías, sino que también permite alargar la vida productiva de las vacas que son incapaces de mantener una gestación, pero que sí ovulan, como en los casos de fibrosis de matriz o de cuello uterino, fracturas, edad, o que tienen problemas de producción, como son pérdidas de cuar-

tos debido a mastitis o gangrena, pero que su calidad genética - justifica su reproducción.

La transferencia de embriones, como la inseminación artificial, puede producir grandes beneficios para los criadores de razas puras y aún para el productor de carne, pero también puede ser desastrosa cuando los principios básicos y la tecnología no son bien conocidos. Dadas las características de esta técnica debería reservarse solamente a las reproductoras de muy alta calidad. Según Evans (1980), en un rebaño solo debe usarse del 2 al 5% de las vacas.

HISTORIA

Aunque es un método de reciente difusión, existen datos sobre el empleo de esta técnica que datan de 1890, en el que Walter Heape de la Universidad de Cambridge Inglaterra realizó con éxito el transplante de embriones de conejos.

Por otro lado Warwick y Berry (1949) y Casida y Meyer (1944), tuvieron resultados satisfactorios al realizar transplantes en ovinos.

Avery Rowson (1951) cuantificó el número de ovocitos primarios en terneras de 9 meses, determinando un rango de 75 000 a 25,000; al comparar esta cantidad con el total de gestaciones ob-

tenidas en la vida productiva de una hembra bovina (alrededor de 2.5 a 3 en México y 6.5 en los USA), descubrió que existía un gran desperdicio de capacidad reproductora, y de este modo consideró la posibilidad de usar la técnica de transplante de embriones en bovinos.

En aquel entonces la inseminación artificial se comenzaba a difundir rápidamente en todo el mundo como un medio barato y efectivo, para lograr el mejoramiento genético en el ganado lechero, por lo que el método de transplante de embriones fue visto como una posibilidad que algún día podría ser realidad.

Hammond (1950), menciona que habría de ponerse mucha atención a los trasplantes de embriones por la posible aplicación práctica que pudieran tener en la ganadería. Para 1951, algunos corderos y uno o dos becerros habían nacido por esta técnica, ya más estudiada por investigadores ingleses, pero los porcentajes de fertilidad en las vacas receptoras era aún bajos. Como resultado de estos trabajos se concluyó que los embriones de bovino, ovino y porcino no podía ser manipulados en la misma forma que los de conejo.

Los trabajos realizados por Rowson y Lawson (1951, 1969, 1975), han sido los más valiosos para el perfeccionamiento de la técnica en los últimos años. Este grupo de investigadores, después de varios estudios han logrado porcentajes de fertilidad aceptables.

Betteridge (1973), recopiló información de varios autores concluyendo que los resultados obtenidos eran satisfactorios y suficientes para poder realizar la técnica con bases comerciales.

ANTECEDENTES SOBRE CLASIFICACION DE EMBRIONES

El trasplante de embrión bovino ha tenido avances muy importantes en los últimos años; conforme esta técnica se ha difundido, se han mejorado los conocimientos sobre el desarrollo del embrión y las formas en que debe ser manipulado.

Boland (1978), Elsdén (1978), Greve (1979) y Renard (1979) han realizado trabajos sobre la morfología de los blastocistos bovinos; las clasificaciones presentadas por estos autores están basadas en el grado de desarrollo de los embriones en un día determinado después de la presentación del calor y la inseminación artificial, determinados estos mediante la morfología de la masa celular (blastocisto propio). Boland y Gordon (1978), realizaron una verificación de las diferencias existentes en la apariencia morfológica de embriones, las cuales fueron hechas por:

- a) Diferencias en el desarrollo sucesivo después de la incubación en el oviducto de coneja.
- b) Por las diferencias en el porcentaje de gestación de vacas receptoras después de la transferencia.
- c) Por el desarrollo sucesivo in vitro de las diversas etapas del Embrión.

Linares y King (1980) hicieron un estudio morfológico de blastocistos colectados en vaquillas con ovulación simple, 7 días después del estro e inseminación artificial, evaluados con la ayuda del microscopio de contraste de fase. De este estudio se llegó a una clasificación de embriones normales -- (EN), embriones en proceso de degeneración (EPD), y embriones degenerados (ED). Los autores vieron que no había diferencia en los diámetros de la zona pelúcida de los tres grupos de -- blastocistos pero si había variación en los diámetros de la -- masa celular de los embriones que estaban en proceso de degeneración y en los degenerados.

Esta diferencia fue altamente significativa ($P < 0.005$). -- El número de células fue mayor en los embriones normales que en -- los anormales (199 contra 58). Esta diferencia también fue altamente significativa. ($P < 0.005$).

En otro trabajo realizado por Linares, King y Plöen -- (1980), se observó el desarrollo precoz de embriones en vaquillas repetidoras, Esto se basó en la apariencia morfológica y número de células de los embriones en comparación a los recolectados de vaquillas primerizas, que fueron usadas como controles. Encontraron que la incidencia de embriones anormales fue mayor en las repetidoras que en las primerizas, y que las anomalías se presentaban principalmente en la organización celular.

Otra descripción del desarrollo temprano del óvulo de vaca, desde la etapa preovulatoria hasta la formación de blastocisto, fue dada por Hamilton (1946). En este trabajo las donadoras fueron sacrificadas a diferentes intervalos entre 22 y 196 horas después de finalizado el estro. También observaron el efecto -- que tenía el suero fetal de becerro, y la albumina de suero bovino en el desarrollo in vitro de embriones bovinos clasificados -- como normales, durante un periodo de cultivo de 130 a 160 horas.

Wright (1980) analizó los resultados de 2286 transferencias de embriones por el método no quirúrgico con el fin de relacionar los factores que pueden afectar la preñez entre embrión y receptora. Los embriones obtenidos fueron clasificados según -- los diferentes grados de desarrollo en: mórula, mórula avanzada blastocisto temprano y blastocisto tardío. A los embriones - -- transferidos se les diferencio, dentro de los grupos de edad, calidad morfológica en:

Grado 1 embriones considerados normales,

Grado 2 embriones con configuración anormal, por pequeñas imperfecciones.

Grado 3 embriones en degeneración pero todavía con células normales.

Encontrando que la calidad morfológica esta relacionada con el porcentaje de gestaciones logradas en cada grupo, lo que-

coincide con Shea (1981).

DESARROLLO EMBRIONARIO

La segmentación produce en el óvulo fecundado una serie - de divisiones celulares que se suceden en una rápida serie. La forma en que ocurren las llamadas divisiones de segmentación varía en las distintas especies animales en correlación con la cantidad de vitelo almacenada en el óvulo con material alimenticio para su crecimiento.

El desarrollo embrionario en los mamíferos ha sido descrito en detalle por Patten (1976). El huso mitótico de la primera división de la segmentación, se forma en ángulo recto con un eje imaginario que atravieza el óvulo (desde el polo animal hasta el vegetativo). El plano de separación entre los blastómeros resultantes (como se llama a las células hijas) se halla en el ecuador del huso y en consecuencia coincide con el eje imaginario del óvulo, establecido por el punto en que los glóbulos polares fueron liberados: (fig. 1, B y C)

Los husos mitóticos para las segundas divisiones de segmentación, se forman en los dos primeros blastómeros poco después -- de su constitución.

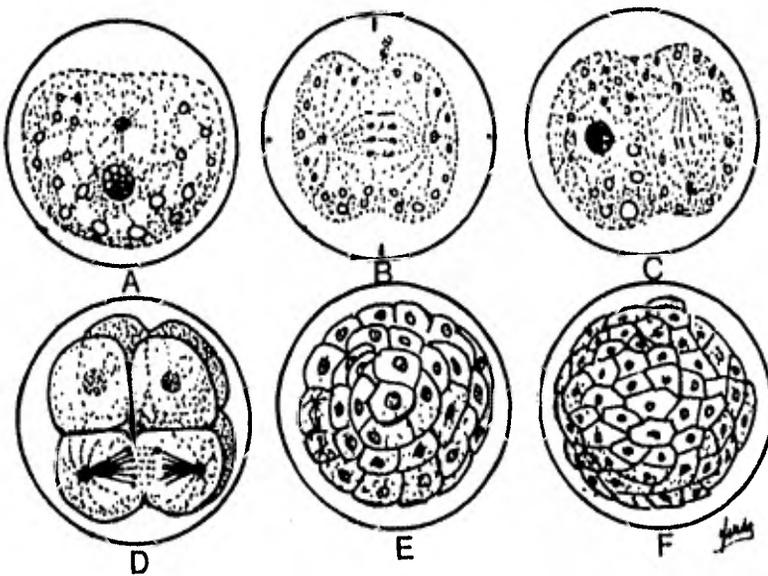


FIG. 1.- Diagramas esquemáticos que muestran la secuencia general de los acontecimientos en la segmentación de un --huevo que tiene solamente una pequeña cantidad de vitelo -- en su citoplasma. (Según WILLIAM PATTEN)

Uno de los blastómeros generalmente se divide un poco -- antes que su compañera, así que hay una etapa transitoria trice- -- lular antes de que se llegue a la característica etapa tetracelu- -- lar (Fig. 1, C). Se suceden nuevas divisiones ordenadas pero con -- una orientación menos precisa. Es tan rápida la sucesión, que el -- intervalo de crecimiento que presenta entre las mitosis, disminu- -- ye. En consecuencia, al principio no hay crecimiento alguno en el -- conjunto de la masa celular y los blastómeros individuales se ha- -- cen cada vez más pequeños después de cada división (Fig. A-F). -- Puesto que la zona pelúcida persiste intacta durante el período -- de segmentación, los blastómeros se ven obligados a disponerse -- dentro de la cavidad esferoidal.

Una vez que se han producido varias divisiones, los blastómeros resultantes aparecen como una pelota sólida formada por células que semejan a una mora. Cuando el embrión se halla en esta situación se dice que está en periodo de mórula, es decir pe queña mora. Fig. 1,E)

Una vez que se ha formado la mórula, ya no se aplica de ordinario el término segmentación a las divisiones celulares que se producen. Durante la división celular se pasa a cada hija -- una porción igual de cromatina que constituye la herencia recibida de los padres por el óvulo fecundado. (Fig. 1,C-E)

Cuando los blastómeros de una mórula comienzan a organizarse y distribuirse alrededor de una cavidad central, decimos que la mórula se está convirtiendo en una blástula, o que el embrión está entrando en el periodo de vesícula blastodérmica. Durante esta fase de desarrollo el embrión aumenta rápidamente su tamaño.

La cavidad central recién formada recibe el nombre de -- blastocele. El espacio del vitelo se mantiene al mismo tiempo -- que aumenta de tamaño, a medida que dentro del mismo se acumula más y más fluido, expandiendo por ello la capa exterior del blastocisto. Con esto se forma una voluminosa membrana que más tarde se convierte en un medio para extraer alimento de la circulación aterina de la madre para el embrión carente de vitelo. --

Por esta razón la capa celular que constituye la pared exterior del blastocisto se llama trofoblasto o trofoectodermo; a esta etapa de expansión celular se le llama blastocisto expandido.

En uno de los polos de vesícula blastodérmica dilatada se agrupa un conjunto de células. Este grupo, a falta de un término mejor, ha sido llamado macizo celular interno. De una manera general, puede decirse que el macizo celular interno está destinado principalmente a la formación del cuerpo embrionario, en tanto -- que la pared delgada exterior de la vesícula blastodérmica contribuye no a la formación del embrión, sino a la formación de las -- membranas protectoras tróficas que se desarrollan en la pared fetal de la placenta.

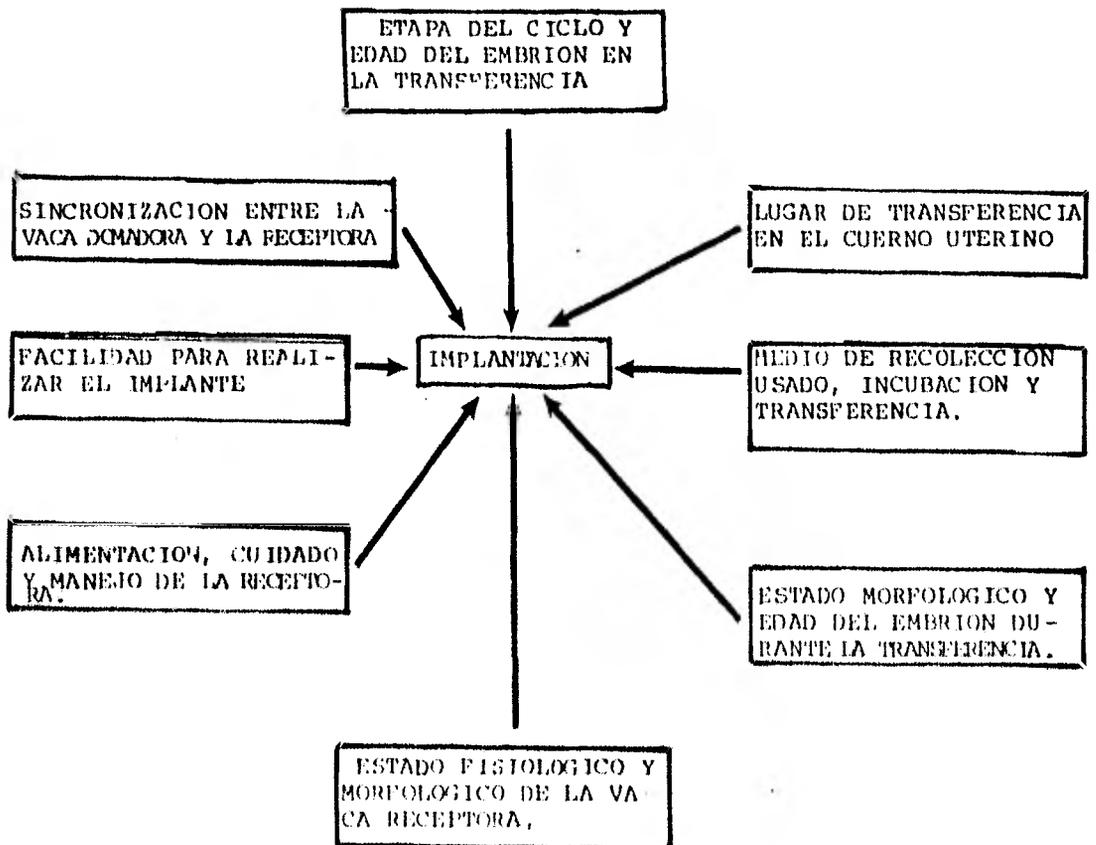
Por esta razón la capa celular que constituye la pared exterior del blastocisto se llama trofoblasto o trofoectodermo; a esta etapa de expansión celular se le llama blastocisto expandido.

En uno de los polos de vesícula blastodérmica dilatada se agrupa un conjunto de células. Este grupo, a falta de un término mejor, ha sido llamado macizo celular interno. De una manera general, puede decirse que el macizo celular interno está destinado principalmente a la formación del cuerpo embrionario, en tanto -- que la pared delgada exterior de la vesícula blastodérmica contribuye no a la formación del embrión, sino a la formación de las -- membranas protectoras tróficas que se desarrollan en la pared fetal de la placenta.

Existen varios factores que pueden afectar el porcentaje de preñez dentro de la transferencia de embriones (Figura 2)

Uno de los más importantes es la capacidad del embrión -- para poder continuar la gestación.

FIGURA 2: FACTORES QUE AFECTAN LA IMPLANTACION EMBRIONARIA



OBJETIVO

El objeto de este trabajo fue clasificar y evaluar los--
embriones de bovinos recolectados 7 días después del estro e in-
seminación artificial (I.A.) de vacas donadoras, para determinar
cual de estos son los más viables al ser transplantados a vacas-
nodrizas.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se desarrolló en la Clínica de transplante de embriones del Instituto nacional de inseminación Artificial y Reproducción Animal (I.N.I.A.R.A.), ubicado en Ajuchnitlásn, Qro.

Se utilizaron 20 vacas raza Charolais, 15 Salers, 9 Criollo, 4 Cebú 2 Simmental, dando un total de 50 animales; las cuales para ser empleadas como donadoras, fueron seleccionadas como base en lo sugerido por Evans (1980):

- 1.- Hembras con características sobresalientes en su raza.
- 2.- Con un tracto reproductor normal, es decir sin afecciones congénita ni problemas adquiridos.
- 3.- Que los ovarios tuvieran ciclos normales.
- 4.- Libres de enfermedades sistémicas, como brucelosis y tuberculosis.
- 5.- Que no estuvieran en lactación.
- 6.- De 3 a 8 años de edad.
- 7.- Que ya hubieran tenido por lo menos un parto.

También se seleccionó un lote de 300 vacas de diferente composición genética como receptoras, de acuerdo a lo sugerido -- por Evans (1980), las cuales cumplieron con los siguientes requisitos.

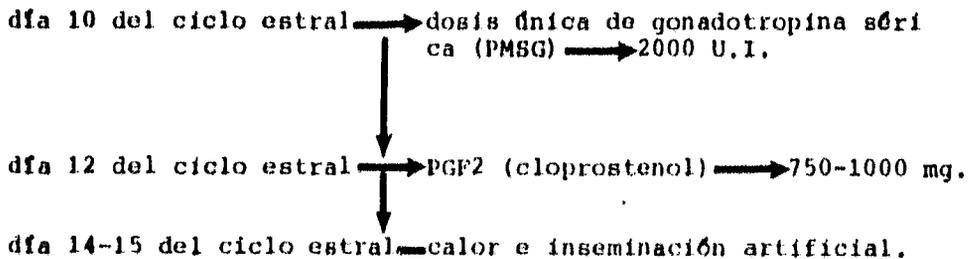
- 1.- Animales jóvenes de entre 16 y 24 meses de edad.
- 2.- Libres de enfermedades sistémicas.
- 3.- Con un tracto reproductor sano.
- 4.- Con ovarios ciclando normalmente.
- 5.- Con un peso de 270 kg. como mínimo.

Ya seleccionados los animales se procedió a detectar dos calores de ciclo regular en todos ellos, para determinar la sincronización de las receptoras y, con base en esto, aplicar el tratamiento de superovulación. Las hembras empleadas en el trabajo, tanto donadoras como receptoras, recibieron el mismo tipo de alimentación.

SUPEROVULACION.

La superovulación fué inducida instintivamente por cualquiera de los dos programas siguientes:

- 1.- Una dosis de gonadotropina sérica



- II.- Hormona folículo estimulante (FSH) en dosis decrecientes.

día 10 del ciclo estral	→	5.0 mg.
día 10 1/2 " " "	↓	→ 5.0 mg.
día 11 del ciclo estral	↓	→ 4.0 mg.
día 11 1/2 " " "	↓	→ 4.0 mg.
día 12 del ciclo estral	↓	→ 3.0 mg. más PF2 α (cloprostenol)
		→ 750-1000 mg.
día 12 1/2 " " "	↓	→ 3.0 mg.
día 13 del ciclo estral	↓	→ 2.0 mg.
día 13 1/2 " " "	↓	→ 2.0 mg.
día 14-15 del ciclo estral	↓	→ presencia de calor e I.A.

Las inyecciones fueron dadas a intervalos de 12 horas.

En ambos casos se administró prostaglandinas F2 alfa 48 horas después de iniciado el tratamiento, con el propósito de inducir la lisis del cuerpo lúteo y apresurar la presencia del estro.

SINCRONIZACION.

Se contó con un lote de 300 vacas receptoras, existiendo una relación de 10 receptoras que entraban en calor por sí so las, por cada donadora, de manera que no fue necesario sincronizar a las vacas nodrizas, para conocer la correspondencia del ca lor en la donadora con el de las receptoras se hizo detección de calores las 24 horas, anotándose el día en que cada vaca había -

presentado estro y si se había detectado antes o después de medio día. Se utilizarón receptoras que habían entrado en calor entre 2 días antes y 1 1/2 días después, contados a partir del día que presentó calor la donadora.

INSEMINACION ARTIFICIAL

Cuando la vaca donadora entraba en calor era palpada rectalmente para saber cuantos folículos de Graff se habían formado en los ovarios como respuesta al tratamiento de superovulación. - Si la vaca demostraba un satisfactorio estímulo hormonal, es decir que tenía un buen número de Folículos de Graff era inseminada en tres ocasiones, usando dos ampollitas de semen cada vez; la -- primera administración al detectar el calor, y la siguiente a intervalos de 12 horas.

RECOLECCION DE EMBRIONES

Esta se llevó a cabo por el método no quirúrgico. La vaca donadora se coloca en una rampa en donde los miembros delanteros se apoyan en un escalón, dando así una inclinación antero posterior a la vaca, lo que facilita la recuperación del fluido de - lavado por gravedad. El proceso se realizó aplicando a la vaca - anestesia epidural con xilocaina al 2%, y utilizando después un - cateter de Foley, el cual consta de dos canales y una vejiga in-- flable que se localiza en la punta del cateter. Este se introdu-

jo a través del cervix y se fijó inflando la vejiga con una jeringa, el propósito de esto es sellar el cervix y poder introducir y recuperar el líquido fácilmente. Por el otro conducto de la sonda se introducen de 30-90 ml. del medio de recuperación, que con ayuda de un masaje uterino y por gravedad, es recolectado en recipientes estériles de cristal. Este procedimiento se repite de 5 a 8 veces.

El medio de recuperación se compone de:

- Solución salina fosfatada buferada (PBS) ---- 100 ml.
- Antibiótico - antimicótico ---- 10 ml.
- Suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor ---- 10 ml.

Una vez terminado la recolección, se observó el fluido en el estereomicroscopio con el fin de encontrar los embriones. Ya localizados se colocaron individualmente en una caja de Petri. Posteriormente se examinaron con mayor detalle al microscopio de contraste de fase para determinar su edad, observar su morfología y encontrar en que etapa de desarrollo embrionario estaban. A cada embrión se le tomó una fotografía a través del microscopio para llevar registros de los embriones obtenidos y de sus características.

La evaluación y clasificación se hizo con los siguientes criterios (Figura 3)

1.- NO FERTILIZADOS.

Incluyeron todos aquellos óvulos que no fueron fecundados, los cuales son facilmente distinguibles, pues en ellos no hay segmentaciones o blastómeros definidos, se observa una sola célula bien definida la cual es plana y con la periferia lisa; se puede llegar a ver óvulos sin fecundar en proceso de degeneración, la cual sera de tipo granulosa difusa.

II.- EMBRIONES DEGENERADOS.

En este grupo fueron incluidos aquellos embriones que presentaban la zona pelúcida rota o aquellos con signos claros de degeneración, es decir zonas claras y oscuras en la masa celular, y embriones que presentaban blastómeros desprendidos o con un buen número de blastómeros en degeneración tipo granulosa, con apariencia difusa.

III.- EMBRIONES JOVENES.

- a) Normales.- Son todos aquellos embriones menores de 4 días de edad y que se encuentran en etapas tempranas de desarrollo, esto es, embriones de 2 a 16 células pero que su morfología es aparentemente normal.
- b) En proceso de degeneración.- Embriones en los que no se hace claro diferenciar cada blastómero y que muestran degeneración difusa en uno o más blastómeros.

IV.- MORULAS

- a) Normales.- En este grupo fueron incluidos todos aquellos em
briones con una edad de 5 a 6 días y que mostraban una clara
diferenciación y uniformidad en los blastómeros, es decir, -
que la unión de todos los blastómeros dan la apariencia de -
una pelota sólida, con una zona pelúcida sin signos de ruptur
a o de degeneración, conteniendo en el espacio perivitelino
uno o dos cuerpos polares pero no otro tipo de detritus celul
ares.
- b) En proceso de degeneración.- Mórulas irregulares con blastó-
meros de diferentes tamaños, o con una zona pelúcida con sig
nos de empezar a degenerarse, con blastómeros más oscuros -
que otros y con cierta degeneración granulosa.

V.- BLASTULAS.

- a) Normales.- Todos aquellos embriones de 7 días de edad que -
tenían una diferenciación en las células trofoblásticas de -
la masa celular interna blástulas las cuales presentaban una
cavidad clara (blastocelo) en un extremo de la masa celular
interna, y donde no hubiera células trofoblásticas desprendid
as en el espacio perivitelino.
- b) En proceso de degeneración.- Blástulas que no presentaban -
una clara diferenciación de las células trofoblásticas de la
masa celular interna (blastocisto propio) y el blastocelo. -

También aquellos embriones en los que la superficie del blas-
tocisto propio presentaba irregularidades, y donde la mayor-
 parte de las células periféricas no muestran relación topo-
 gráfica. Por último, se tomaron aquellos que contenían de-
 tritus celulares en el espacio perivitelino.

VI. BLASTOCISTOS EXPANDIDOS.

- a) Normales.- Todos aquellos embriones de 8 días de edad en los que hubiera un blastocele expandido apreciable con una apro-
 piada agrupación celular, y donde la superficie del blastocis-
 to propio fuese homogéneo. Pueden llegarse a ver blastocis-
 tos expandidos contraídos dando la apariencia de ser una móru-
 la, esto indica que la zona pelúcida esta a punto de romperse
 y dejar en libertad al blastocisto propio.
- b) En proceso de degeneración.- Blastocistos en los cuales el -
 blastocele no esta bien diferenciado, y donde no hay una apro-
 piada agrupación celular o que la superficie del blastocisto-
 propio no sea lisa.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

Una vez clasificados los embriones se realizó la transfe-
 rencia a la vaca receptora, para lo cual esta fue palpada rectal-
 mente con el objeto de implantar el embrión en el cuerno uterino-
 correspondiente al ovario que presentaba el cuerpo lúteo. El im-
 plante se realizó por el método quirúrgico con anestesia epidural

y local, se incidio el flanco y se expuso el cuerno uterino. En el primer tercio de este se realizo una puncion con un microestilete para introducir la micropipeta con el embrión en 0.2 ml. de medio de transplante y depositarlo en la luz del cuerno.

El diagnóstico de gestación se realizo a los 45 días, - confirmándolo a los 60.

FIG. 3 CARACTERISTICAS PARA LA EVALUACION Y CLASIFICACION DE EMBRIONES BOVINOS

	NORMAL	EN PROCESO DE DEGENERACION	DEGENERADO
OVULO SIN FECUNDAR			
EMBRION JOVEN (2-3 días de edad)			
MORULA (5-6 días de edad)			
BLASTULA (7 días de edad)			
BLASTOCISTO EXPANDIDO (8 días de edad)			

RESULTADOS Y DISCUSION

Los embriones colectados 7 días después de la inseminación artificial, pueden estar en diferentes etapas de desarrollo embrionario, el cuadro 1 muestra que la mayoría de los embriones recuperados al 7o. día se encontraban en estado de mórula, blástula o blastocisto expandido.

Dado el número de embriones obtenidos en las diferentes categorías, solo fue posible probar la eficiencia de la evaluación usada en el caso de las mórulas. Para ello se realizó una prueba estadística exacta de Fisher, de la que resultó que los embriones en etapa de mórula, clasificadas como normales, tienen más oportunidad de implantarse, que los considerados en proceso de degeneración. La diferencia fue altamente significativa ($P < 0.001$). La estimación de dicha diferencia mediante la Delta de Somers, es de 0.2993, lo que nos indica que las mórulas clasificadas como normales tienen una probabilidad de continuar la gestación 29.23% mayor que aquellas clasificadas en proceso de degeneración.

Se encontro que de las mórulas clasificadas como normales el 46.66% se implantaron, seguidas por las blástulas (37.25%) y los blastocistos expandidos (36.66%).

CUADRO 1
 CLASIFICACION Y EVALUACION DE LOS EMBRIONES
 RECOLECTADOS EN LOS 86 TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACION.

Clasificación	Evaluación	Obtendidos	Transplantes	Gestaciones	Implantación (%)
No fecundados	-	108	0	-	-
Degenerados	-	13	0	-	-
E. Jóvenes (Menores de 4 días de edad)	N	19	11	0	-
	EPD	1	1	0	-
Mórulas (5-6 días de edad)	N	30	30	14	46.66
	EPD	18	18	3	16.66
Blastulas (7 días de edad)	N	55	51	19	37.25
	EPD	5	1	1	100
Blastocistos expandidos (8 días de edad)	N	31	30	11	36.66
	EPD	0	-	-	-
Total para edades	N	135	122	44	36.06
	EPD	24	20	4	20.00
TOTAL	-	280	142	48	33.80

N = Normales

EPD = En proceso de degeneración.

Esto concuerda con los reportes publicados por Boland, y col. (1978), Elsdén y col. (1978), quienes indican que los mejores resultados fueron obtenidos con embriones clasificados como normales exceptuando el estado morfológico de desarrollo.

Linares y King (1980) observaron que de 5 embriones colectados de vaquillas repetidoras por medio de ovulación simple, uno fue normal (20%), contra 4 anormales (80%), mientras que en las vaquillas vírgenes la relación fue de 4 normales -- (57%), contra 3 anormales (43%), y que de 44 huevos recolectados de vaquillas repetidoras superovuladas, 22 fueron clasificados como normales, 12 en proceso de degeneración, 7 degenerados y 3 infertilizados.

De los 10 huevos provenientes de las vaquillas vírgenes, 9 eran normales y uno degenerado. Con esto llegamos a -- concluir que las mayores variaciones en el desarrollo embrionario ocurrieron en las vaquillas repetidoras en comparación con las vaquillas vírgenes.

Wright (1980) hace un estudio, en donde relaciona los factores que pueden afectar los porcentajes de preñez entre embrión y receptora. Para ello clasifico los embriones en 4 grupos:

Mórula temprana, mórula avanzada, blastocisto temprano y blastocisto tardío.

A la vez a estos los dividio en 3 grados de calidad - morfológica:

- Grado 1.- Embriones normales,
- Grado 2.- Embriones con configuración anormal
- Grado 3.- Embriones degenerados.

Encontró que los mejores porcentajes de preñez fueron para blastocistos tempranos (65%) y blastocistos tardíos (64%), y más bajos para las mórulas tempranas (44%) y mórulas tardías (55%). En lo referente a calidad morfológica son mejores los resultados para embriones de grado 1 que los embriones de calidad 2 ó 3.

El cuadro 2 muestra la distribución de los embriones-trasplantados, de acuerdo a la raza de donadoras, relacionados al número de gestaciones logradas. El número mayor de embriones obtenidos en una superovulación fue de 20, correspondiendo a una vaca Charolais. De la raza Simmental no se logró coleccionar ningún embrión. Se observan grandes diferencias en la tasa de (implantación) por raza (cuadro 3); sin embargo al comprobar disimilitud entre Cebú, Salers y Charolais, mediante -- una prueba de Kruskal-Wallis, el resultado no es significativo ($P < 0.1$). Lo que puede deberse al bajo número de observaciones, principalmente en el caso de la raza Cebú.

CUADRO 2
 NUMERO DE EMBRIONES Y GESTACIONES OBTENIDOS
 DE ACUERDO A: RAZA, TIPO Y CALIDAD.

Raza	Número de vacas	Número de tratamientos	Clasificación	Embriones transplantedos		Gestaciones	
				N	EPD	N	EPD
Charolais	20	39	Emb. Jóvenes	3	0	0	-
			Mórulas	15	3	5	0
			Blast.	37	1	11	1
			Blast. Exp.	30	0	11	-
Salers	15	26	Emb. Jóvenes	3	0	0	-
			Mórulas	15	10	8	3
			Blast.	11	0	6	-
			Blast. Exp.	0	0	-	-
Criollo	9	12	Emb. Jóvenes	0	0	-	-
			Mórulas	0	1	-	0
			Blast.	2	0	2	0
			Blast. Exp.	0	0	-	-
Cebú	4	6	Emb. Jóvenes	5	1	0	0
			Mórulas	1	3	1	0
			Blast.	1	0	0	1
			Blast. Exp.	0	0	-	-
Simmental	2	3	Emb. Jóvenes	0	0	-	-
			Mórula	0	0	-	-
			Blast.	0	0	-	-
			Blast. Exp.	0	0	-	-

CUADRO
 PORCENTAJE DE ANIDACION POR RAZA DE LA DONADORA

Raza	Total Embriones transplantados.	Total de gestaciones	Implantación (%)
Charolais	89	28	31.46
Salers	39	17	43.58
Criollo	3	2	75.00
Cebú	11	1	9.09
Simmental	0	-	-
TOTALES	142	48	39.78

El promedio de embriones obtenidos por cada tratamiento de superovulación fue de 3.25; para los embriones transplantados por tratamiento el promedio fue de 1.65. Se logró una media de 0.5581 gestaciones por cada superovulación realizada.

Al someter los datos a una prueba Kruskal-Wallis, las diferencias observadas en cuanto a porcentaje de anidación por grupos de edad, sin considerar calidad morfológica (cuadro 4,) fueron significativas ($P < 0.05$). Conforme a lo encontrado por Wright (1980), se esperaba que los embriones jóvenes, dado su escaso desarrollo, tuvieron una menor tasa de implantación, por lo que se realizó una prueba similar a la-

CUADRO 4

NUMERO DE EMBRIONES TRANSPLANTADOS Y GESTACIONES LOGRADAS DE ACUERDO A
LA EDAD DE ESTOS Y A LA SINCRONIZACION DONADORA-RECEPTORA

Clasific.		-2 días	-1 1/2 días	- 1 día	-1/2 día	0 días	+1/2 día	+1 día	+1 1/2 días	TOTAL
Embriones	T	0	0	0	0	3	6	1	2	12
Jóvenes	G	-	-	-	-	0	0	0	0	0
	%	-	-	-	-	0	0	0	0	0
	T	0	2	0	5	18	14	8	1	48
Mórulas	G	-	0	-	1	8	4	4	0	17
	%	-	0	-	20.00	44.44	28.57	50.00	0	35.41
	T	0	1	4	18	23	5	1	-	52
Blastulas	G	-	0	2	9	6	2	1	-	20
	%	-	0	50.00	50.00	26.08	40.00	100	-	38.46
	T	3	7	2	4	9	5	0	0	30
Blastocis- tos expan-	G	2	3	1	0	3	2	-	-	11
didos	%	66.66	42.85	50.00	0	33.33	40.00	-	-	36.66
	T	3	10	6	27	53	30	9	3	142
TOTAL	G	2	3	3	10	17	8	5	0	48
	%	66.66	30.00	50.00	37.03	32.07	26.66	55.55	0	33.80

T Transplantados

G Gestaciones

0 días indica que entraron en calor simultaneamente donadora y receptora

Signo (-), indica el número de días que la nodriza entro en calor antes que la receptora

Signo (+), indica el número de días que la nodriza entro en calor despues que la receptora.

anterior, eliminando los datos relativos a los embriones jóvenes, con lo que el resultado no fue significativo ($P < 0.9$).

Esto demuestra que si bien las mórulas, blástulas y blastocistos expandidos tienen una diferencia importante en relación a los embriones jóvenes el porcentaje de gestación es semejante entre los tres primeros grupos mencionados. Ninguno de los embriones jóvenes transplantado prosiguió su gestación; lo más probable es que haya sucedido alguna de estas tres circunstancias siguientes:

- 1) Que los embriones ya estaban muertos,
- 2) Que la ovulación se retardara 3 ó 4 días de cuando se esperaba.
- 3) Que el desarrollo embrionario estaba severamente retardado

Quando un embrión empieza su división celular y no muestra signos de anormalidades, lo más probable es que prosiga su desarrollo a mórula, de ahí a blástula y a blastocisto-expandido. Pero si un embrión muestra un atrazo o algo anormal en su etapa joven, difícilmente llegará a etapas más avanzadas, de ahí que sea muy raro encontrar blástulas o blastocistos expandidos en proceso de degeneración o degenerados. La mayoría de los embriones que llegan a blastocisto expandido, son embriones que tuvieron un buen desarrollo desde - - - - -

la fecundación.* Las mórulas con evidencias de degeneración - dan como resultado un bajo porcentaje de preñez, comparado con los embriones de morfología normal.

Si se obtiene embriones de buena apariencia, sin de - formación, blastómeros desprendidos u otras malformaciones, el porcentaje de gestación sera mayor.

En este estudio, el 33.8% de los embriones transplan - tados prosiguió la gestación. En el cuadro 5 se anotan los -- porcentajes de preñez logrados por diferentes autores.

* Sanderson Leslie, comunicación personal (1982).

CUADRO 5
PORCENTAJES DE PREÑEZ DESPUES DE LA TRANSFERENCIA

Reportes Previos	Porcentaje de Preñez de embriones únicos.
Boland y col. (1975)	25
Sreanan (1975)	25 (bilateral)
Boland (1976)	17
Boland y col. (1976)	12
Greve (1976)	32
Hahn y col. (1977)	35.3 (día 7-9) 56.6 (día 10-11) 38.4 (día 12-13)
Renard y col. (1977)	36.8 (unilateral) 45.0 (bilateral)
Boland y col. (1978)	33.3
Greve y Jensen (1978)	33.0
Newcomb y col. (1978)	35.0
Trouson y col. (1978)	46.0

Tomado de Greve, T. y Lehn-Yensen, H. (1979).

CONCLUSIONES

- Las mórulas normales tienen una probabilidad de proseguir su gestación de 29.23% mayor que los clasificados como en proceso de degeneración.
- Los embriones jóvenes tienen una tasa de implantación muy reducida.
- El porcentaje de implantación es muy similar entre mórulas, blástulas y blastocistos expandidos.
- Las vacas Criollas y Simmental resultaron bajas en la respuesta superovulatoria.
- No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la tasa de implantación entre las razas Charolais, Salers y Cebú.

LITERATURA CITADA

- Avery, T.L., Fahning, M. L., Pursel, V.C., y Graham, E.F.
(1962) Investigation associated with the transplantation of -
bovine ova.
J. Reprod. Fertil. 3, 229-238
- Bedirian, K.N., Burside, E.B., Kanagawa, H., Wilton, J. (1975)
Aplicación comercial del transplante de embriones en los anima
les domésticos. Revista Mundial de Zootecnia, No. 13, 22-26
- Betteridge, K.J. (1980)
A commemoration of the fifth anniversary of the first recovery-
of a bovine embryo. The bovine practitioner, No. 15, 4-7
- Boland, M.P., Crosby, T.E. and Gordon, I. (1978)
Morphological normality, of cattle embryos following superovu-
lation using PMSG. Theriogenology, 10: 175-180
- Bradley M. Datten (1976)
Embriología Humana, Editorial Ateneo, pág. 52-56
- Casida, L.E., Warwick, E.J., and Meyer, J.K. (1944)
Survival of multiple pregnancies induced in the ewe following
treatment with pituitary gonadotrophins. J. Anim. Sci. 3, 22

Chistie, W.B., Newcomb, R., and Rowson L.E.A. (1979)

Embryo survival in heifers after transfer of an egg to the uterine horn contralateral to the corpus luteum and the effect of treatments with progesterone or MCG on pregnancy rates. J. Reprod. Fert. 56. 701-706.

Elsden, R.P., Nelson, L.D., and Seidel, G.E. Jr. (1978)

Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. Theriogenology 9: 17-26

Evans, J.F. (1980)

Embryo transfer in cattle. Continuig education for the practicing veterinarian. Articulo No. 8 Vol. II, No. 6 junio, 89-96

Greve, T., Lehn-Hensen, H., (1979)

Non surgical transfer of 6 1/2-7 1/2 day of embryos to lacting dairy cows under farm conditions Acta. Vet. Scand. 20, 135-144

Hamilton, N.S., and Laing, J.A. (1946)

Developmente of the egg of the cow up to the stage of blasto - cyst formation. J. Anat. 80: 194-204

Hammond, J. (1950)

The possibility of artificial pregnancy in cattle. J. Minist. Agric. 57, 67-72

Heape W. (1890)

Preliminary note on transplantation and growth of mammalian --
ova within a uterine foster-mother. Proc. Roy. Soc., B48: 457.

Citado por Beridian (1975)

Hunter, G.L., Adams, C.E., and Rowson, L.E.A. (1955)

Inter-breed ovum transfer in sheep. J. Agric. Sci. Cam 46: 143

Languan, J. (1976)

Embriologia Humana. Editorial Interamericana pág. 24-27

Lawson, R.A.S., Rowson, L.E.A., and Adams, C.E. (1972)

The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their
viability after re-transfer to heifers. J. Reprod. Fert. 28:
313-315

Lawson, R.A.S., Rowson, L.E.A., Moor, R.M. and Tervit, H.R.
(1975)

Experiments on egg transfer in the cow and ewe; dependence of
conception rate on the transfer procedure and stage of the-
oestrus cycle. J. Reprod. Fert. 45; 101-107.

Linares, T., and King, W.A. (1980)

Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. Theriogenology 14: 123-133

Linares, T., King, W.A, and Plöen, L. (1980)

Observation on the carly development of embryos from repeat breeder heifers. Nord. Vet Med. 32: 433-443

Newcomb, R., and Rowson, L.E.A. (1975)

Conseption rate after uterine transfer of cow egg, in relation to synchronizaton of oestrus and age of eggs. J. Reprod. Fert. 43: 539-541

Renard, J.P., and Heyman Y. (1979)

Variable development of superovulated bovine embryos between day 6 and day 12. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19: 1589-1598

Rowe, F., Del Campo, M.R., Critser, J. ., Ginther Q.J. (19

Embryo transfer in cattle: non-surgical collection techniques. Am. Vet. Res. vol. 41 No. 7: 1024-1028

Rowson, L.E.A., Moor, R.M., and Lawson, R.A.S. (1960)

Fertility following egg transfer in the cow; efect of method, medium and synchronizaton of oestrus. J. Reprod. Fert. 18: - - 517-523

Rowson, L.E.A. (1951)

Methods of inducing multiple ovulation in cattle. J. Endocrin.
7: 260

Seidel, G., E., y Braual L. (1981)

Superovulación y transferencia de embriones de vaca. Informa-
ción científica y tecnológica Vol 3 Num. 5, 27-31

Shea, B.F. (1981)

Evaluating the bovine embryo. Theriogenology 15: 31-42

Tronson, A.O., Rowson L.E.A., and Willadsen S.M. (1978)

Non-surgical transfer of bovine embryos. Vet. Rec. 102: 74-75

Warwick, B.L., Berry, R.O. (1949)

Intergeneric and intraespecific embryo transfer in sheep and -
goats. J. Jereford 40: 279

Wright. M. J. (1980)

Non-surgical embryo transfer in cattle. Embryo-recipient inter-
actions. Theriogenology. 15: 43-56