

01694



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL.

“UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE TRANSFERENCIA DE  
EMBRIONES PARA EVALUAR LA ESTACIONALIDAD  
REPRODUCTIVA EN GANADO CEBÚ”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

YSABEL CRISTINA MÁRQUEZ ALVARADO

TUTOR: PhD. Carlos Salvador Galina Hidalgo.  
COMITÉ TUTORAL: PhD. Horacio Merchant Larios.  
PhD. Luis Fernando Covarrubias.

MÉXICO, D.F.

2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## DEDICATORIAS

A Dios todo poderoso por ser fuente inagotable de mi Fe.

A mis Padres, por ser el sostén de mi vida, gracias por nunca dejarme caer.

A mi pequeño Mauricio, por ser mi inspiración, este logro es tuyo.

A mis hermanos, gracias por apoyarme en todo momento y por ser parte de mi vida.

A mis Abuelos por el amor incondicional que me han dado y su comprensión en todo momento.

A Jorge, por su constante apoyo y cariño.

A mis amigos y compañeros de la UNIHM, especialmente a la Dra. Aura López por confiar siempre en mi.

A mis compañeros del área de Fisiología Animal, por haberme dado la oportunidad de estar aquí.

A mis amigos Paula, Norma, Paulo, Ivan y Alex, por estar siempre a mi lado, por su amistad y por haber compartido conmigo momentos tan especiales, los quiero mucho.

A todas las personas que de alguna manera estuvieron a mi lado durante la realización de mi doctorado. Gracias.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor, Dr. Carlos Galina Hidalgo por apoyarme siempre y confiar en mi.

Al Dr. Horacio Merchant Larios, por sus enseñanzas, por su gran apoyo y por ser mi Maestro. Gracias Doc.

A la Dra. Norma Moreno Mendoza, por creer en mí, por su apoyo y colaboración en todo momento.

A mi comité tutorial y a mis jurados, Dr. Luis Fernando Covarrubias, Dr. Jaime Gallegos, Dra. Teresa Sánchez, Dr. Javier Valencia, gracias por enriquecer este trabajo con sus correcciones.

A mis compañeros de laboratorio, Rosy, José, Alejandro, Eli, Vale, Vero, por siempre encontrar apoyo en ustedes.

A mis compañeros de Maestría y Doctorado, Paula, Ivan, Paulo, Martín, Sy, Horte, Eli, Sol, Niko, Toño, Henry, Pancho, Adrianita, Agustín, Julio Cesar, Ricardo y Rouget por haber compartido bellos momentos con Uds.

Al los Drs. Jorge Avila, Horacio León, Horacio Ruíz, por el apoyo técnico prestado.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por permitirme ser parte de ella.

Al FONACYT y a la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" por financiar mis estudios.

Al PAPIIT por apoyar este trabajo de investigación.

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES  
PARA EVALUAR LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN GANADO  
CEBÚ

ÍNDICE

I. RESUMEN GENERAL	iii
II. ABSTRAC	v
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	6
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	9
3.1 Estacionalidad Reproductiva en Ganado Bovino	9
3.2 Superovulación	11
3.3. Transferencia de Embriones	13
3.4 Características Morfológicas y Evaluación de Embriones	15
3.5 Muerte Celular	18
V. EXPERIMENTOS	21
4.1. Experimento 1	21
Comparación de las Técnicas Estereoscópica, Microscopía de Luz y Ultraestructural para la Evaluación de Embriones de Bovino	
4.1.1 Introducción	23
4.1.2 Material y métodos	25
4.1.3 Resultados	28
4.1.4 Discusión	36
4.1.5 Literatura citada	40
4.2. Experimento 2	42
Evidencia de Daño Celular en Embriones Bovinos Criopreservados Bajo Condiciones Tropicales, Utilizando la Técnica de Tunel.	

4.2.1 Introducción	44
4.2.2. Material y métodos	46
4.2.3. Resultados	49
4.2.4. Discusión	56
4.2.5. Literatura citada	60
<b>4.3. Experimento 3</b>	<b>62</b>
Evaluación de la Viabilidad de Embriones Producidos por Vacas Cebuínas en el Trópico Durante dos Épocas del Año.	
4.3.1. Introducción	63
4.3.2. Material y métodos	65
4.3.3. Resultados	69
4.3.4. Discusión	79
4.3.5. Literatura citada	83
<b>VI. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>86</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b>	<b>92</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>95</b>
7.1 Artículo Publicado	

## I. RESUMEN GENERAL

El presente estudio tiene como objetivo valorar el efecto estacional sobre el proceso reproductivo en ganado *Bos Indicus*, evaluado a través de la manipulación hormonal exógena. Para tal efecto los animales fueron inducidos a producir ovulaciones múltiples durante las épocas de secas y lluvias para medir el efecto que tienen cada uno de estos períodos en la respuesta superovulatoria y calidad de embriones producidos. La hipótesis fue que la población folicular expuesta al tratamiento hormonal es distinta en las dos épocas. Para cumplir nuestro objetivo se efectuaron 3 experimentos, en el primero de ellos se realizó una evaluación de la técnica rutinaria de clasificación de embriones, los cuales fueron obtenidos de 23 vacas Brahman x Suizo en el estado de Veracruz. En el experimento 2, se analizaron embriones bovinos F1, criopreservados por el FIMEGEN en diferentes años con el objeto de evaluar la calidad del material biológico almacenado. En el último experimento, se determinó el efecto estacional sobre la calidad de embriones colectados de 40 vacas Cebú adultas en Chiapas tratando a los animales en dos épocas (secas y lluvias). La sincronización se llevó a cabo administrando 6 mg de Norgestomet mas 5 mg de Valerato de Estradiol (Syncromate B®, Rhone Merieux. México) y superovuladas con 240 mg de Folltropin-V (Vetrepharm México). La respuesta superovulatoria y la colección embrionaria se realizó 7.5 días postinseminación. Los embriones se analizaron bajo el microscopio estereoscópico de acuerdo a criterios estándar. Una vez clasificados los embriones como de buena, regular y mala calidad se procesaron para su evaluación al microscopio de luz y electrónico. Otro grupo de embriones de la misma manera clasificados, colectados tanto en época de secas como en lluvias se procesaron para detectar fragmentación de DNA (apoptosis), mediante la técnica de Tunel. De la misma manera, se analizó el grado de apoptosis en embriones de buena y regular calidad colectados en cada época, los cuales fueron congelados en glicerol y descongelados a los 3 meses. La muerte celular encontrada en estos embriones se comparó con el grado de apoptosis en embriones almacenados durante los años 1988, 1989, 2000 y 2002 para relacionar el tiempo de almacenamiento con la calidad del material criopreservado. En el primer experimento, se observó que la evaluación de embriones por medio

de microscopía estereoscópica fue subjetiva, ya que algunos embriones que se clasificaron por esta técnica como de buena calidad al ser evaluados por microscopía de luz y electrónica presentan características de embriones en estado de degeneración. Al evaluar el índice de apoptosis en embriones criopreservados se encontró que los de menor tiempo de almacenamiento presentan menor número de células Tunel-positivo ( $p < 0.001$ ) comparado con embriones almacenados por largos periodos de tiempo. Al comparar el grado de apoptosis entre embriones frescos y congelados se observó un aumento ( $p < 0.05$ ) en el número de células Tunel-positivas en embriones criopreservados. Finalmente, en la época de secas se colectaron 2.7 embriones/vaca, mientras que en la de lluvias se obtuvo 3.9 embriones/vaca, siendo superior la respuesta superovulatoria en la época de lluvias. No se encontraron diferencias ultraestructurales entre embriones colectados en secas y en lluvias. Sin embargo, los embriones de buena y regular calidad criopreservados en lluvias presentaron una disminución ( $p < 0.05$ ) del número de células Tunel-positivo comparado con los de la época de lluvias. En base a estos resultados, se puede concluir que existe un efecto estacional sobre el proceso reproductivo en ganado *Bos indicus*; ya que, los embriones colectados en época de lluvias poseen mayor viabilidad, al presentar un número menor de células apoptóticas cuando son comparados con embriones colectados en época de secas. Desde el punto de vista práctico, se hace necesario encontrar técnicas alternas y no invasivas para evaluar la viabilidad embrionaria previa a la transferencia, como herramienta para mejorar la técnica de transferencia de embriones y de esta manera incrementar su valor comercial. Igualmente, queda demostrado que los programas que apuntan hacia el uso de esta técnica con el fin de mejorar la productividad en los climas cálidos, deben contemplar la evaluación de embriones almacenados. Finalmente, es importante recomendar que los programas de transferencia de embriones que se realicen en las zonas de climas cálidos, se aboquen a concentrar los trabajos inherentes a la colección y congelamiento de embriones en la mejor época del año (lluvias), lo que podría resultar en mejores índices de gestación una vez que los embriones sean transferidos.



## ABSTRAC

The present study aims to discern if there is a seasonal effect on reproduction in *Bos Indicus* cattle assessed through the response of hormonal treatment. To this effect, 40 cows were superovulated in two seasons of the year (dry and wet) comparing the number of ovulations, number and quality of embryos produced. The hypothesis to be tested was the follicular population in the two periods is different hence the response to the variables measured. Three experiments were undertaken, in the first a critical assessment of the microscopical evaluation performed by clinicians was carried out in 23 Brahman x Swiss cows in the State of Veracruz. In experiment 2 and analysis was undertaken in F1 embryos cryopreserved in the FIMEGEN in 1988, 1989, 2000 and 2002 in order to evaluate the quality of the embryos stored awhile ago. The last experiment aimed to test the seasonal effect in the quality of embryos collected in two seasons. To accomplish this objective, 40 Zebu cows raised in the State of Chiapas were superovulated and synchronized. The superovulatory response was measured 7.5 days after insemination. Embryos were analyzed using an stereoscopic microscope following standard criteria. Embryos were classified as good, fair and bad quality and evaluated using electron microscopical techniques. Another group of embryos was evaluated as fresh to detect DNA fragmentation. Finally, another set of embryos collected in the two seasons were frozen, thawed 3 months later and exposed to the Tunel technique to detect apoptosis en the embryo cells. In the first experiment 25% of the embryos classified as of good quality did not have the characteristics of quality assessed by more precise techniques such as light and electron microscopy Conversely, 15% of the embryos classified as fair did not meet the standards required to even accept freezing. When evaluating the degree of apoptosis in the second experiment there was significant difference of time where the embryos spent stored and cell damage ( $p < 0.001$ ) Moreover when comparing fresh and frozen embryos a significant difference ( $p < 0.05$ ) was also observed in the number of positive cells to the Tunel technique indicating a possible effect of storage on embryo survival. Finally, 2.7 embryos/cow were obtained in the dry season as compared to 3.9 embryos/cow in the wet being this season superior in

the response. No differences were found in the ultrastructural characteristics of embryos collected in the two seasons. However, embryos collected in the wet season and classified as good and fair showed significantly less number of Tunel positive cells ( $p < 0.05$ ). Based on these results it is possible to conclude that a seasonal effect is present in embryos collected in the two seasons utilized for comparison in *Bos indicus* cattle as embryos obtained in the wet season have less numbers of apoptotic cells. From the practical viewpoint it is necessary to research on non-invasive techniques to evaluate embryos collected under tropical conditions as the current technique does not seem to reflect the real status of embryos health to be able to resist insults such as freezing and hence jeopardizing the possible fertility in cows where embryos are transferred.

### III. INTRODUCCIÓN

Los climas cálidos húmedos de México, representan la mejor alternativa para afrontar los requerimientos alimenticios de la población, existen estudios que indican que aproximadamente el 50% del total de las vacas en producción láctea se encuentran en estas zonas, sin embargo, estas aportan sólo un 25% de la producción de leche y 39% de la carne en canal, debido a que se basan en sistemas de producción tradicional (Rodríguez, 1976; De la Fuente, 1982). Dentro del contexto de la producción animal, los bovinos ocupan un lugar preponderante, lo que depende en gran medida, de una actividad reproductiva normal (Riviera *et al.*, 1989). Sin embargo, la mayoría de los investigadores coinciden al afirmar que la baja productividad en esta especie constituye un grave problema en los países de clima tropical (Ames y Ray, 1983; García *et al.*; 1985; González-Stagnaro, 1986). En general, la productividad animal en las zonas tropicales es inferior a la obtenida con animales manejados en sistemas especializados en clima templado. Debido a esta problemática, los productores de las zonas tropicales tienen serios problemas para su desarrollo económico.

Con el fin de aumentar la productividad animal en estas zonas, se ha trabajado en la producción de un genotipo bovino que permita mejorar los índices de desarrollo en la cría, la eficiencia reproductiva y que posea mayor adaptación (González-Stagnaro, 1986). Una opción, es la introducción de programas de transferencia de embriones (TE) o más recientemente de programas de maduración *in vitro* y fertilización de ovocitos, técnicas que hacen posible el disponer de bancos de embriones a un precio reducido para la transferencia comercial, con el propósito de mejorar la calidad genética.

La estrategia de producir bancos de embriones F1 en el trópico ha ganado mucha popularidad, debido al mejoramiento (vigor o heterosis) que se observa en la capacidad productiva, resistencia a enfermedades y adaptabilidad al medio en la primera cruce entre las razas *Bos taurus/Bos indicus* (Cunningham, 1989). En un trabajo realizado por Madalena *et al.* (1989) se analizó la información productiva y reproductiva de 376 vacas durante 3

ciclos productivos, quedando demostrada la superioridad de la cruce F1. McDowell (1985) analizó 107 investigaciones en la producción de leche en ganaderías doble propósito en países tropicales, encontrando los mejores parámetros productivos para el genotipo F1 (Holstein/Cebú). Estos datos indican que la vaca F1 tiene mayor potencial productivo y reproductivo por ser más resistente a los factores ambientales adversos que imperan en zonas tropicales.

Teodoro *et al.* (1986) propusieron la TE como una alternativa viable para la producción de hembras F1, con una benéfica relación costo-beneficio al comparar los costos de la producción de los reemplazos. A este respecto, en Chiapas, México, el FIMEGEN ha desarrollado un programa de T.E con una continuidad de 12 años, transfiriendo embriones criopreservados F1 (Holstein/Gyr), en ganaderías doble propósito. A pesar de la gran aceptación que tiene este tipo de programas por parte de los productores (Molina, 2003), los resultados en condiciones de trópico son muy inferiores a los reportados en países de clima templado. Esta disparidad, pudiera deberse a que por las condiciones ambientales adversas de las zonas de climas cálidos, el número de embriones colectados es inferior, lo que hace que los criterios de selección de embriones sean menos estrictos. Además, en estos centros de producción masiva de embriones en ocasiones no es posible controlar de manera exhaustiva las condiciones de almacenamiento, lo que afecta los resultados en las tasa de gestación tras la TE.

En el caso de las zonas tropicales, en donde predomina el ganado cebuino (*Bos indicus*), los métodos de superovulación sin duda, son poco practicados. Aún cuando gran parte de la producción de carne depende de la explotación de este tipo de animal debido a sus características de adaptabilidad. Sin embargo, a pesar de esta situación existe alguna información al respecto, así, Randel (1984) reportó evidencias de la influencia de los efectos estacionales sobre la función reproductiva de vacas *Bos indicus*. Igualmente, Tucker (1982) mencionó la ocurrencia de cambios fisiológicos en hatos bovinos que se atribuyeron a la variación de la temperatura ambiental, ya que, cuando esta es mayor a los 27 grados centígrados ocasiona la presencia

de ciclos estrales más largos, decremento en la duración e intensidad del estro y una mayor incidencia de mortalidad embrionaria. Por lo tanto, la reducción en el número de embriones transferibles ocasionada por una pobre respuesta superovulatoria y una baja tasa de fertilización podría deberse al estrés ambiental (Hansen *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de esta información Shea. (1984) no encontró diferencias en la cantidad de embriones transferibles por año ni por mes.

Por el contrario, Bastidas y Randel (1987) realizaron un estudio a lo largo de siete años en vacas Brahman con un total de 1841 superovulaciones y reportaron que la cantidad de embriones transferibles por vaca se encuentra influenciada tanto por la estación del año ( $p < 0.06$ ) como por el mes ( $p < 0.06$ ). Así, el número de embriones transferibles fue menor durante el invierno que durante el otoño, primavera y verano. En otro trabajo realizado recientemente (Molina, 2000), se demostró que existen importantes diferencias en la calidad de los embriones colectados en épocas de secas y de lluvias, a pesar de ser similar la respuesta superovulatoria en cantidad y tipos de folículos presentes en los ovarios durante las dos épocas, sugiriendo por tanto que la población folicular evaluada por ultrasonido no tiene importantes diferencias en la forma y tipo de folículos pero sí en la calidad embrionaria. De esta manera se plantea en este estudio evaluar la calidad de los embriones colectados durante la época de secas y lluvias de manera de establecer cual es la mejor época para realizar las transferencias y/o preparar embriones para los programas. Por lo cual, se realizaron estudios morfológicos de embriones bovinos de buena, regular y mala calidad, así como, la evaluación del grado de apoptosis en estos grupos de embriones durante dos épocas del año con la finalidad de conocer el efecto de la estacionalidad sobre el proceso reproductivo del ganado cebuino.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 3.1. Estacionalidad Reproductiva en Ganado Bovino

Las prácticas reproductivas en las zonas tropicales son de cierta manera contradictorias, la mayoría de los productores realizan la Inseminación Artificial (IA) en los meses del final de la sequía lo cual coincide con la época de mayor parición (Baca *et al.*, 1998). Sin embargo, durante esta época los animales están perdiendo condición corporal por el efecto del amamantamiento y la escasa producción forrajera (Randel, 1984). Posiblemente por estos factores los técnicos que practican la transferencia de Embriones (TE) tratan de evitar la época de sequía (Montiel *et al.*, 2000). A pesar de esto, los resultados de la IA no son mejores en la época de lluvias (Galina y Arthur, 1990) y si lo son en TE sin existir una explicación fisiológica de esta variación.

Información proveniente de estudios de campo realizados en México, indica que la respuesta superovulatoria durante la temporada de secas genera una importante respuesta superovulatoria pero un menor número de embriones transferibles (Avila, comunicación personal). Este concepto se apoya en algunas investigaciones que indican un efecto estacional en la fertilidad, dada probablemente por una pobre nutrición (Randel, 1984; Galina y Arthur, 1990), aunado a la necesidad en el incremento del nivel de consumo para suplir los requerimientos de mantenimiento (Massey y Oden, 1984). En un estudio realizado por Comin *et al.* (2002) observaron que la restricción aguda del consumo en vacas de carne induce una reducción en el crecimiento y diámetro del folículo dominante y se encuentra un mayor porcentaje de folículos anovulatorios. Sin embargo, las vacas seleccionadas como donadoras son generalmente suplementadas antes de los tratamientos, disminuyendo la posibilidad de fracasos debida a una pobre nutrición. A pesar de ello, existen efectos estacionales que afectan la calidad de los embriones transferibles en ganado *Bos indicus*, los cuales presentan sus picos de fertilidad durante los meses de junio a agosto, momento en el cual las condiciones para el pastoreo son óptimas (Galina y Arthur, 1990).

Así Bastidas y Randel (1987) observaron de un total de 1841 colecciones provenientes de 813 donadoras Brahman, un máximo de 4.2 embriones por lavado durante el otoño y un mínimo de 2.9 durante el invierno. Estos datos sugieren que el número de embriones recuperado por vaca se ve afectado por la época del año. Igualmente, reportaron que la mayor cantidad de embriones viables se encontró durante los meses de marzo a octubre, decreciendo durante noviembre y diciembre. De acuerdo con Bastidas y Randel (1987), esta diferencia se debe a una mayor disponibilidad de alimento. Anteriormente, en otro estudio ya se había demostrado que en esa época las vacas *Bos indicus* presentan mayores índices de fertilidad (Randel 1984), Igualmente, Massey y Oden (1984) demostraron la existencia del efecto estacional en el porcentaje de recuperación de embriones transferibles, al obtener en vacas Brahman un promedio de 2.6 embriones transferibles en época de invierno y de 4.4 durante los meses de primavera.

Además, Barros *et al.* (1996) determinaron la existencia de un efecto estacional en la dinámica folicular de vacas en condiciones tropicales, demostrado por un aumento en el número de folículos de diversos tamaños en la época de lluvias. Por el contrario Zeitoun *et al.* (1996) trabajando en dos temporadas del año con 60 vacas Brahman, no encontraron diferencias en cuanto a la dinámica folicular, pero sí en cuanto a las concentraciones de progesterona ( $P < 0.01$ ). Sus resultados indicaron que este puede ser una de las causas para que las hembras cebuínas presenten mayores tasas de preñez en los meses de mayo, junio y julio

Rubio *et al.* (1989) en un estudio realizado con vacas cebú Indobrasil no observaron diferencias estadísticas en cuanto a las concentraciones de progesterona a lo largo del año, ni en cuanto al porcentaje de vacas en estro, que fluctuó entre 45 y 60 %; pero, si encontraron diferencias en los porcentajes de fertilidad, siendo mayor en los meses de lluvias (60%) que en la época de secas (8%). Basándose exclusivamente en esta información, se puede asumirse que al practicarse la IA en la época de secas la posibilidad de muerte embrionaria se vería aumentada. En efecto, en un estudio preliminar realizado por Martínez *et al.* (2000) determinaron en vacas Cebú un 30% de mortalidad

embrionaria diagnosticada a través del empleo de la ultrasonografía transrectal. Sin embargo, en este estudio no se realizó una comparación con los meses de lluvia. Se puede concluir que a pesar de que el ganado bovino no es una especie estrictamente estacional, la eficiencia reproductiva es afectada por cambios en las condiciones climáticas.

### **3.2. Superovulación**

La superovulación es un método que consiste en promover el crecimiento simultáneo de varios folículos por acción de FSH y LH, desde el estado antral hasta la ovulación. Por lo tanto, el objetivo principal de los tratamientos superovulatorios es aumentar el número de folículos ovulatorios para así obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez (Monniaux *et al.*, 1983 y Callesen *et al.*, 1996). Sin embargo, en la práctica, la respuesta a estos tratamientos es muy variable y difícil de predecir. Siendo importante entender los factores que afectan la obtención de embriones transferibles después de la superovulación y la respuesta en diversas épocas del año. Durante cada ciclo estral, entre 20 a 30 folículos son estimulados para crecer en varias series de ondas, pero únicamente un folículo sigue creciendo hasta que finalmente llega a ovular. El mecanismo mediante el cual este folículo se hace dominante es por un aumento en los niveles de estradiol, inhibina y otros factores que hacen que los demás se vuelvan atrésicos (Fortune, 1993).

Generalmente, el tratamiento se inicia entre los días 8 y 12 del ciclo estral (estro = día 0) y se basa en el comienzo de la maduración de una onda folicular. Lindsell *et al.* (1986) demostraron que se puede alcanzar una mayor respuesta superovulatoria si el tratamiento se inicia el día 9 del ciclo (día 8 post-ovulación) comparado con la que se obtiene comenzando los días 3, 6 ó 12. Estas observaciones se han corroborado por evidencias ultrasonográficas; ya que, Ginther *et al.* (1989) demostraron que la segunda onda folicular comienza en promedio 8.5 días después de la ovulación (día 9.5 del ciclo) en vacas que poseen 3 ondas foliculares y 9.5 días pos ovulación (día 10.5 del ciclo) en las vacas de 2 ondas. En este mismo estudio se comprobó que las



vacas con 2 ondas de crecimiento folicular tienen ciclos más cortos (18 a 20 días) que las de 3 oleadas (21 a 23 días), siendo esta información de utilidad; ya que, es importante conocer la longitud del ciclo estral previo, para ajustar el momento de iniciar los tratamientos superovulatorios.

En el ganado bovino una gran cantidad de estos folículos tienen capacidad de desarrollarse completamente (Occhio *et al.*, 1999), cuando son estimulados con hormonas exógenas. A este respecto, Adams *et al.* (1994) mencionaron que la mayoría de los folículos pueden ser estimulados hasta llegar a ovular. Para conseguir la máxima respuesta Goulding *et al.* (1991) han administrado de gonadotropinas en momentos predeterminados del ciclo estral, seguido de control de la luteólisis, sincronización de la ovulación y fertilización. Además, Guilbault *et al.* (1991) demostraron que la presencia de un folículo dominante en el momento de la iniciación del tratamiento disminuye la respuesta superovulatoria en un 40 a 50 %. Por otra parte, Romero *et al.* (1991) observaron una alta correlación entre el número de folículos pequeños (3-6 mm de diámetro) presentes al comienzo del tratamiento y la respuesta superovulatoria. Igualmente, Van der Schans *et al.* (1991) observaron una alta correlación entre el número de folículos menores de 5 mm de diámetro y la respuesta superovulatoria. Aunque, estos estudios fueron realizados en vacas Holstein bajo condiciones de clima templado. Sin embargo, Molina (2000) no encontró diferencias en la respuesta al tratamiento ni en la población folicular, utilizando vacas Cebú para comparar dos épocas del año en el trópico húmedo de México.

A este respecto, Tucker (1982) mencionó la ocurrencia de cambios fisiológicos en hatos bovinos que se atribuyeron a la variación de la temperatura ambiental; ya que, cuando esta es mayor a los 27 grados centígrados ocasiona la presencia de ciclos estrales más largos, decremento en la duración e intensidad del estro y una mayor incidencia de mortalidad embrionaria. Así, Kafi y McGowan (1997) reportaron que el estrés ambiental altera la cascada de las enzimas esteroideogénicas en las células de la teca del folículo dominante. Igualmente se ha observado (Badinga *et al.*, 1993) que el primer folículo ovulatorio posparto es de menor diámetro y el cuerpo lúteo (CL)

que se desarrolla produce menor cantidad de progesterona (CL sub-funcional). Por lo tanto, la reducción en el número de embriones transferibles ocasionada por una pobre respuesta superovulatoria y una baja tasa de fertilización podría deberse al estrés ambiental (Hansen *et al.* 2001).

Por otra parte, trabajos recientes (Molina, 2000; Páez, 2002), han determinado que existen importantes diferencias en la calidad de los embriones colectados en época de secas y de lluvias, a pesar de ser similar la respuesta superovulatoria en la cantidad y tipos de folículos presentes en los ovarios durante las dos épocas, sugiriéndose por tanto que la población folicular, evaluada por ultrasonido, no tiene importantes diferencias en la cantidad y tamaño de los folículos, pero sí en cuanto a la calidad embrionaria. Por lo tanto, estas observaciones merecen mayor investigación en un futuro próximo.

### **3.3. Transferencia de Embriones**

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

En los últimos años la TE ha ganado mucha popularidad, tal es así que Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) ha reportado un nuevo record mundial en la colección y transferencia de embriones bovinos producidos *in vivo* para el año 1999. Los datos reportan que se transfirieron 10.000 embriones caprinos y ovinos, 500 equinos y 520,000 embriones bovinos, lo que demuestra que la industria de la TE continua siendo muy activa, lo cual, obviamente, es un beneficio para los productores (Thibier, 2000).

En el caso de los embriones bovinos, estos fueron colectados de 120,000 donadoras, lo que genera un promedio de 6 embriones transferibles

por vaca, de los cuales el 50% se transfirieron en fresco y el 50% restante se congelaron. En términos de distribución geográfica es en América del norte, específicamente USA (143,057) y Canadá (48,615) en donde mayor número de embriones bovinos se produjeron en 1999. Europa transfirió 129,780, Japón ha contribuido con 70.000 embriones transferidos, cifra que supera los reportados en años anteriores (Thibier, 2000).

A pesar de los avances logrados en los países desarrollados, la situación no se presenta igual en regiones de clima tropical, en donde por las características de la zona la respuesta superovulatoria puede ser muy variable, lo que resulta en un alto número de embriones anormales o con retardo en el desarrollo (Kafi y McGowan, 1997). A este respecto, Rutledge (2001) observó la existencia de una relación lineal entre la calidad del embrión y la temperatura ambiental, así, por cada grado centígrado de incremento en la temperatura durante el periodo entre la inseminación y la recolección de embriones, aumenta en un 15% la proporción de embriones clasificados como de regular o de mala calidad.

En un trabajo realizado por Lerner et al. (1986), encontraron que de 2048 superovulaciones se recuperan en promedio 11,5 estructuras y 6,2 embriones transferibles por vaca, sin embargo, la variabilidad en la respuesta superovulatoria así como en la calidad de los embriones fue alta, observándose que en el 24% de las colecciones no se obtuvieron embriones viables, 64% de las donadoras produjeron menos embriones que el promedio general y solo el 30 % de las colecciones sumaron el 70% de los embriones. A pesar de esta información Shea (1984) no encontró diferencias en la cantidad de embriones transferibles por año ni por mes.

Asimismo, los criterios de inclusión para transferir los embriones son menos estrictos debido al bajo porcentaje de embriones transferibles que se obtienen. Esto aunado al hecho de que las técnicas convencionales de evaluación de embriones (microscopia estereoscópica) han demostrado ser muy subjetivas, conlleva a que los índices de gestación sean bajos. Aguilar et al. (2002) en un estudio realizado en el trópico mexicano, determinaron que la

evaluación de embriones por medio de microscopía estereoscópica es muy subjetiva, ya que algunos embriones que se clasificaron por esta técnica como de buena calidad al ser evaluados por microscopía de luz y electrónica presentan características de embriones en estado de degeneración. Embriones con estas características generalmente se transfieren o más grave aún se congelan, y esto podría ser una de las causas del bajo porcentaje de fertilidad en los programas de TE.

### **3.4. Características Morfológicas y Evaluación de Embriones**

Un aspecto de gran importancia para el éxito de los programas de transferencia, es la evaluación de los embriones y aunque estos métodos han demostrado ser efectivos en la predicción de la fertilización en los grupos de embriones, no así en la determinación de la sobrevivencia de estos (Rondeau *et al.*, 1995). El desarrollo embrionario y la diferenciación requieren de varios pasos: segmentación, compactación, formación del blastocelo, expansión y maduración de la zona pelúcida. El desarrollo de estas características, así como el tiempo que tardan en llevarse a cabo, son usados como indicadores de la salud y calidad embrionaria (Occhio, *et al.*, 1999).

En general un embrión bovino de menores a 7 días cuenta con un diámetro de  $193.5 \pm 28.4 \mu\text{m}$ . La zona pelúcida es de aspecto rugoso (Fléchon y Renard, 1978), presentan blastómeros pequeños y redondeados y a veces puede observarse que están separados por pequeños espacios intercelulares; en su interior los núcleos son redondos con nucleolos grandes. El citoplasma es electrodensito con un citoesqueleto bien desarrollado (King *et al.*, 1992). Son abundantes las mitocondrias de formas redondeadas o alargadas, y están asociadas a los retículos endoplásmicos rugosos y lisos; el aparato de Golgi es conspicuo y es frecuente encontrar formaciones de membranas en el citoplasma perinuclear. Abundantes poliribosomas están intercalados en el retículo endoplásmico rugoso. Además, es normal encontrar vesículas lipídicas que deben irse reduciendo en número después del día 7 (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994). Inicialmente el cuerpo precursor del nucleolo se transforma en un anillo vacuolado, posteriormente se observa ya reticulado y

es totalmente activo (King, *et al.*, 1992). La cavidad del blastocele contiene material granular fino (Mohr y Trounson 1981; Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994).

En el trofoblasto se observan microvellosidades en la cara externa de la membrana, y consiste de células epiteliales planas; también pueden observarse vesículas picnóticas, pero no muy abundantes (Mohr y Trounson, 1981; King *et al.*, 1992); Sus células están ancladas entre sí y a otros blastómeros, por desmosomas y uniones apicales (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994). A veces pueden encontrarse muchos filamentos finos asociados a los desmosomas y se extienden a lo largo de la región de la unión entre las células del trofoblasto. Se cree que estos microfilamentos tengan una función estructural en la célula, dándole forma, rigidez y soporte (Mohr y Trounson, 1981). Debido a que las células del trofoblasto tienen abundantes ribosomas y polirribosomas, se ven más oscuros (Mohr y Trounson, 1981). En ovinos el haloplasma tiene varios centriolos, microtúbulos y varias mitocondrias alargadas con cristales transversales. Las células endodermales empiezan a migrar de la masa celular a la capa trofoblástica (Wintenderger-Torres y Fléchon, 1971)

Con respecto a la evaluación embrionaria, Shamsuddin y Rodríguez-Martínez (1994) observaron que los embriones cultivados en medio libre de suero con insulina, transferrina y selenio (SFM), o en suero de vaca en estro con células epiteliales del oviducto bovino (BOEC), que inicialmente se clasificaron de buena calidad, presentaron espacios entre las células de la masa interna, un menor desarrollo y menor número de desmosomas, lo que le da una apariencia de menor unión entre blastómeros. Las microvellosidades se presentaron más cortas y en escaso número. El citoplasma de los blastocistos presenta más fagosomas y abundantes gotas lipídicas, degranulación del retículo endoplásmico y aumento del contenido lisosomal. Más aún, Rondeau *et al.*, (1995), señalaron que aquellos embriones con buenas características morfológicas no siempre tienen una actividad metabólica normal, ya que, pueden tener defectos funcionales a nivel citoplasmático o submicroscópico que no se detectan por medio de la evaluación por microscopía de luz, pero sí

por microscopía electrónica. Quizás esto sea la causa de que aunque se observen de buena calidad en el microscopio estereoscópico, no puedan llevar a cabo una gestación. Igualmente, Aguilar (2001) reportó que la evaluación de los embriones por medio de microscopía estereoscópica es subjetiva, ya que, embriones clasificados de calidad regular al ser evaluados por microscopía electrónica se clasifican en la categoría de embriones de buena calidad y embriones con buenas características morfológicas externas, ultraestructuralmente ya se encuentran en etapa de degeneración. Debido a lo anterior, en la actualidad se emplean técnicas en las que se analizan los parámetros metabólicos que pueden dar una idea de si podrán o no continuar su desarrollo en el útero después de la transferencia.

Uno de los parámetros estudiados es el metabolismo de la glucosa, ya que es necesario para la formación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Gardner, 1987) durante el desarrollo de los embriones. En varios estudios en embriones de ratón y de bovino (Gardner, 1987), se ha visto que mientras mayor sea la utilización de la glucosa, aumentan las posibilidades de ser viable después de la transferencia. Por otra parte, Shea (1981) encontró que algunos embriones que estaban llenos de material de desecho, hasta el punto de no permitir localizar el núcleo, eran capaces de producir gestaciones. De la misma manera, Rondeau *et al.*, (1995) encontraron que aquellos embriones con buenas características morfológicas no siempre tenían una actividad metabólica normal, ya que podrían tener defectos funcionales a nivel citoplasmático o submicroscópico, no detectables por medio de la evaluación morfológica al momento de la obtención.

Además de la problemática observada en el momento de la recolección y evaluación también deben considerarse los posibles cambios al congelar y descongelar los embriones. Es importante hacer notar que la criopreservación está influenciada por un elevado número de variables, de forma que ninguna aproximación que contemple sólo una o parte de los aspectos implicados garantiza una eficacia total. A pesar de esto, y con independencia del sistema utilizado, los principios básicos persiguen una protección de la célula frente a los principales efectos perjudiciales del proceso (Dobrinsky, 1996). Durante el

proceso de congelamiento, los embriones son expuestos a niveles potencialmente tóxicos de crioprotectores y se están alterando las condiciones fisiológicas de las células, además de ser sometidos a solidificación durante el enfriamiento (Baguisi *et al.*, 2000). Todos estos cambios pueden producir la muerte del embrión, la cual es atribuida básicamente a la reducción del volumen de la célula por debajo de un límite crítico, donde la deshidratación osmótica provoca un estrés que origina una pérdida de lípidos de la membrana celular (Schneider *et al.*, 1984).

Así, varios autores encontraron que los embriones descongelados presentaban una mayor cantidad de anomalías, como la presencia de una cavidad del blastocele pequeña, colapso del blastocisto, degranulación del retículo endoplásmico, daño estructural de las membranas celulares y nucleares, aumento del contenido lisosomal, y fagocitosis de blastómeros degenerados entre otras alteraciones. La fagocitosis de blastómeros degenerados por células vecinas es un indicio de muerte celular programada (Kenjikimura *et al.*, 2000). Mohr y Trounson (1981) las atribuyeron al dimetilsulfóxido (DMSO) que se ocupa para el descongelamiento, sin embargo, Hyttel *et al.* (1986) concluyeron que éstos daños son causados por la formación de "fracturas planas" en la matriz extracelular después de la transferencia de la pajilla que contiene el embrión al nitrógeno líquido.

### **3.5. Muerte Celular**

El análisis del balance entre la proliferación celular y la muerte celular ofrecer información importante para el entendimiento de las características biológicas y funcionales de los tejidos (Kimura *et al.*, 2000). Durante el desarrollo temprano de los embriones, se ha encontrado que ocurre muerte celular y arresto mitótico. Sin embargo, se conoce muy poco sobre el mecanismo por el cual ocurre ésta muerte en los blastómeros, así como, su relación con la muerte embrionaria precoz (Matwee *et al.*, 2000). Así, la apoptosis (muerte celular por suicidio o muerte celular programada) es considerada una muerte celular autodirigida la cual se basa en mecanismos

genéticos que característicamente afectan una célula y que pueden ser iniciadas por un reloj interno o igualmente se puede iniciar por acción de agentes extracelulares (Manjo y Joris, 1995).

El mecanismo de apoptosis morfológicamente se caracteriza por que la célula se encoge, hay condensación citoplasmática y de la cromatina y se presenta fragmentación del DNA en oligonucleosomas de 185 pb que se ubican alrededor de la membrana nuclear. Durante la fase final del proceso apoptótico, el núcleo puede romperse (Kariorrhexis) formando fragmentos nucleares picnóticos. La membrana citoplasmática forma procesos que se rompen formando cuerpos apoptóticos, los cuales contienen fragmentos nucleares, citoplasma y organelas citoplasmáticas, finalmente estos cuerpos apoptóticos pueden ser fagocitados por macrófagos o por células vecinas (Betts y King, 2001). La células adyacentes pueden migar o proliferar de manera que ocupan el espacio dejado por las células apoptóticas (Kimura *et al.*, 2000).

En varios estudios ultraestructurales se ha observado la incidencia de muerte celular espontánea en blastocistos de una variedad de especies incluyendo bovinos (Byrne *et al.*, 1999), sugiriendo que la muerte celular en el blastocisto es un mecanismo por medio del cual los embriones pueden eliminar células de la masa interna que aún poseen el potencial para formar trofoectodermo, reduciendo el riesgo de expresión ectópica durante la diferenciación de las capas germinales. Igualmente puede ocurrir con la finalidad de eliminar células anormales o células con un potencial inadecuado de desarrollo (Matwee *et al.*, 2000). Algunos autores coinciden que el mayor porcentaje de células con signos de apoptosis se localiza en la masa celular interna. En un estudio Donnay *et al.* (1999) reportaron 84% de núcleos positivos a Tunel (técnica para detección de apoptosis) en células de la masa interna, contra 16% en células del trofoectodermo.

Byrne *et al.* (1999) encontraron la presencia de células con características apoptóticas en embriones bovinos con morfología normal a partir de los estadios de 9 a 16 células, estando ausente en edades anteriores,



lo que podría indicar que existe una sincronía entre el momento en el cual se activan la maquinaria genómica y los mecanismos apoptóticos. La activación simultánea de estos mecanismos puede tener como objetivo la eliminación de células no viables de embriones en desarrollo.

La apoptosis está muy relacionada con la calidad del embrión, a este respecto, Byrne *et al.* (2000) demostraron que los blastocistos con menor número de células y mayor incidencia de células con características apoptóticas, poseen menor potencial de desarrollo al ser cultivados. Esto demuestra que cuando el porcentaje de muerte celular llega a un nivel crítico es dañino para el desarrollo embrionario, a pesar de ser un mecanismo fisiológico.

Por lo tanto, la evaluación de la muerte celular temprana difícil de detectar por medio de microscopía de luz podría ser estimada por medio de microscopía electrónica y técnica para detectar apoptosis. Estos criterios permitirán tener un mejor entendimiento de la predicción del estado de salud de un embrión por microscopía de luz. Asimismo, por medio de la microscopía electrónica y la determinación del grado de apoptosis se podría establecer si los embriones son más susceptibles de ser afectados en las épocas del año que se estudiaron en este trabajo.

## V. EXPERIMENTOS

### 4.1. Experimento 1

#### COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS ESTEREOSCÓPICA, MICROSCOPIA DE LUZ Y ULTRAESTRUCTURAL PARA LA EVALUACIÓN DE EMBRIONES DE BOVINO

Márquez YC<sup>1</sup>, Aguilar MM<sup>1</sup>, Galina CS<sup>1</sup>, Merchant H<sup>2</sup>, Montiel F<sup>3</sup>, Canseco R<sup>3</sup>,

1. Departamento de Reproducción, FMVZ, UNAM
2. Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIB, UNAM
3. Departamento de Reproducción, FMVZ, UNAV

#### RESUMEN

El aspecto de mayor importancia para el éxito de la transferencia de embriones (TE), es la evaluación del grado de desarrollo y la calidad embrionaria. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue comparar la evaluación morfológica de los embriones por las técnicas de estereoscopia, microscopía de luz y electrónica con el fin de dictaminar la precisión de la primera sobre la calidad morfológica del embrión evaluado por técnicas invasivas pero más precisas. Se utilizaron veintitrés vacas Brahman x Suizo, sincronizadas con 6 mg de Norgestomet mas 5 mg de Valerato de Estradiol (Syncromate B®, Rhone Merieux. México) y superovuladas con 240 mg de Folltropin-V (Vetrepharm México). La colección embrionaria no quirúrgica se realizó a los 7.5 días postinseminación. Los datos se evaluaron por estadística descriptiva. En total se recolectaron 78 embriones que se clasificaron por microscopía estereoscópica, encontrándose 51.2% (40) de buena calidad, 25.3% (19) regulares y 24.3% (19) de mala calidad. Posteriormente, en la evaluación por microscopía de luz de los mismos embriones se observaron, un 25.6% (20) buenos, 32.0% (25) regulares y 42.3% (33) malos. Finalmente, en la evaluación

por microscopía electrónica, se encontraron 24.3% (19) embriones de buena calidad; 29.3% (23) de calidad regular y por último 46.1% (36) de embriones de mala calidad. En este estudio, se observó que la evaluación de embriones por medio de microscopía estereoscópica fue muy subjetiva, ya que algunos embriones que se clasificaron por esta técnica como de buena calidad al ser evaluados por microscopía de luz y electrónica presentan características de embriones en estado de degeneración. Embriones con estas características generalmente se transfieren o más grave aún se congelan, y esto podría ser una de las causas del bajo porcentaje de fertilidad en los programas de transferencia de embriones.

#### 4.1.1. INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) se ha desarrollado con la finalidad de optimizar los recursos genéticos, tanto de las hembras como de los sementales. Sin embargo, uno de los principales obstáculos que se han observado es la gran variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios, principalmente en el número de embriones transferibles recuperados (Boland 1978, Elsdén *et al.*, 1978, Goulding *et al.*, 1991). Además, se han encontrado grandes diferencias en los índices de gestación obtenidos con los diversos protocolos ensayados para la TE, (Elsden *et al.*, 1978, Reichenbach *et al.*, 1992, Greve *et al.*, 1995, Schmidt *et al.*, 1995, Silva *et al.*, 1996). Así, las variaciones en los distintos protocolos son amplias, por lo que éstas disparidades han afectado de manera negativa la diseminación de la técnica a un mayor número de productores. El aspecto de mayor importancia para el éxito de la TE, es la evaluación del estado de desarrollo embrionario, así como, su calidad (Linder y Wrigth; 1983) y esto se realiza generalmente mediante la observación estereoscópica que no siempre ha probado ser un método efectivo en la predicción de la fertilidad a obtener con los diferentes grupos de embriones (Rondeau *et al.*, 1995). De este modo, en un estudio realizado por Farin *et al.* (1995) encontraron que varios observadores con experiencia, al realizar la evaluación de 40 embriones en diferentes estadios de desarrollo y grados de degeneración, sólo estuvieron de acuerdo en el 68.5% de los diagnósticos, existiendo mayor dificultad para diferenciar entre los embriones de buena y regular calidad. En otro estudio, Rondeau *et al.* (1995) evaluaron el metabolismo de los embriones, encontrando que el 47% de los considerados como de buena calidad no tenían una actividad metabólica normal, debido quizá, a defectos funcionales citoplásmicos o submicroscópicos que no pueden ser detectados en la evaluación estereoscópica. Este problema es todavía más agudo en condiciones tropicales, en donde debido al estrés térmico al cual están expuestos los animales la respuesta superovulatoria puede ser muy variable lo que resulta en un alto número de embriones anormales o con retardo en el desarrollo (Kafi y McGowan, 1997). Asimismo, los criterios de inclusión para transferir los embriones son menos estrictos. Por lo tanto, una forma alternativa para caracterizar la calidad de los embriones de

una manera más detallada, es por la observación de sus estructuras por microscopía electrónica, la cual a pesar de ser una técnica invasiva, permitiría conocer con precisión si existen los cambios degenerativos que puedan ocurrir en el embrión a pesar del diagnóstico favorable previo.

### **OBJETIVO GENERAL**

En la siguiente investigación se propuso, comparar la evaluación morfológica de los embriones por las técnicas de estereoscopia, microscopía de luz y electrónica con el fin de dictaminar la precisión de la primera sobre la calidad morfológica del embrión evaluado por técnicas invasivas pero más precisas.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer las características morfológicas de los embriones de buena, regular y mala calidad, a través del uso del microscopio de luz y electrónico.
2. Comparar la eficiencia de la técnica de evaluación de embriones por microscopía estereoscópica con técnicas más precisas como la microscopía de luz y electrónica.

#### **4.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### ***Localización***

La fase de campo, se realizó en un rancho particular localizado en el municipio de Pochotla, Estado de Veracruz, México. El clima de la zona se clasifica como caliente húmedo, sin una temporada de sequía definida, la precipitación pluvial es de 1780 mm anuales y la temperatura promedio de 21.8 °C, con rangos de 13 a 40 °C (García, 1981).

##### ***Animales***

Se utilizaron veintitrés vacas del genotipo Brahman x Suizo, mayores de 6 años con un peso promedio de 450 kg y un rango en condición corporal de 2.5 a 4 puntos (Pullan, 1978). Asimismo, las vacas se examinaron para verificar que se encontraran libres de alteraciones anatómicas o fisiológicas que pudieran afectar su fertilidad.

##### ***Superovulación***

El tratamiento consistió en la aplicación de dos implantes auriculares que contienen 6 mg de Norgestomet, mas una inyección de 5 mg de Valerato de Estradiól y 3 mg de Norgestomet (Syncromate B/Rhone Merieux) durante 9 días. Al séptimo, octavo, noveno y décimo día de retirados los implantes, se aplicaron 240 mg de Folltropin-V (Vetrepharm Canadá) y al noveno y décimo día se administraron 25 mg de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (Lutalyse/Upjhon). La detección de celos se hizo en forma continua, iniciándose a las 12 horas posteriores al retiro del implante, y el servicio por medio de inseminación artificial se realizó a las 12 y 24 horas después del inicio del celo. La recolección embrionaria se realizó por medio de lavado uterino, a los 7.5 días posteriores a la primera inseminación

##### ***Evaluación de los Embriones***

Inmediatamente los embriones fueron evaluados por un técnico calificado y clasificados como de buena, regular y mala calidad de acuerdo a los criterios descritos por Linder y Wright (1983), en: óvulos no fecundados, mórula inmadura, mórula joven, mórula compacta, blastocisto inmaduro,

blastocisto maduro, blastocisto expandido y blastocisto en eclosión. Considerando el grado de calidad se clasificaron en:

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

Una vez realizada la evaluación los embriones de cada categoría se sometieron al análisis ultraestructural. Para lo cual, se fijaron en Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965) durante 30 minutos, luego se colocaron en buffer de Cacodilato de sodio pH 7.4. Una vez en el laboratorio, se realizó una post-fijación en solución de Tetróxido de Osmio al 1% para posteriormente deshidratarlos en alcoholes a concentraciones crecientes (70, 80, 90, 100%) e incluirlos en EPON 812 y proceder a realizar los cortes seriados de 1 micra, los cuales se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% y se analizaron al microscopio de luz. Estas evaluaciones se hacen con la finalidad de observar el nivel en el cual se deben realizar los cortes finos e igualmente se aprovechó para clasificar nuevamente los embriones utilizando los mismos criterios que para microscopía estereoscópica. Finalmente, sobre la base de estas observaciones, se obtuvieron los cortes finos para realizar estudios de ultraestructura en el microscopio electrónico Zeiss 9<sup>a</sup>, de acuerdo a los criterios descritos por Merchant y Chang (1971), en:

- **Buenos:** Blastómeros bien delimitados, núcleos con cromatina densa y bien localizada. Dentro de los blastómeros se presentan vesículas lipídicas no muy abundantes, mitocondrias de forma redonda y/o alargada. Presencia de ribosomas y polirribosomas, como gránulos oscuros. Con un mayor aumento es posible observar citoesqueleto bien desarrollado, así como el aparato de Golgi. También hay vesículas

lisosomales poco abundantes. En la cara de los blastómeros que se encuentra dirigida hacia el espacio perivitelino se observan microvellosidades largas y abundantes y entre los blastómeros pueden observarse las uniones celulares que están formadas por desmosomas.

- **Regulares:** Blastómeros bien delimitados, núcleos con cromatina densa y mitocondrias de forma redonda y/o alargada. Hay vesículas lipídicas abundantes, así como lisosomales y se empieza a ver fagocitosis. Existen espacios en donde no se observa ningún aparato celular y las uniones entre los blastómeros son menores, dando la apariencia de estar separados. Las microvellosidades son más cortas y menos abundantes.
- **Malos:** Los blastómeros no están bien delimitados y se observa fagocitosis, llegando a desaparecer la membrana nuclear. Hay grandes cantidades de vesículas lipídicas y lisosomales, las mitocondrias no se observan bien definidas y casi no se aprecian las microvellosidades.

### ***ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva, calculándose los porcentajes del número de embriones en las categorías de buena, regular y mala calidad, en las evaluaciones con microscopio estereoscópico (embriones en fresco), con microscopio de luz (embriones fijados) y con microscopio electrónico. 1



#### **4.1.3. RESULTADOS**

##### ***EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES POR MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA***

En total se recuperaron 78 embriones, siendo 51.2% (40) de buena calidad, 24.3% (19) regulares y 24.3% (19) de mala calidad (cuadro 1). En la figura 1-1-a, se puede observar un blastocisto clasificado como de buena calidad, el cual se caracteriza por tener un estadio de desarrollo acorde con el día en que se realizó la colección. Igualmente, poseen adecuadas características morfológicas como son blastómeros compactos y de forma poligonal, color ámbar, sin vesículas evidentes y sin daños en la zona pelúcida. Por otro lado, los embriones de calidad regular presentaron forma irregular y en el interior de los blastómeros, se observaron gránulos blancos que podrían ser vesículas lisosomales. Se observan pocos blastómeros extruídos y desechos celulares en el espacio perivitelino, no se observaron alteraciones en la zona pelúcida (figura 1-1-b). Los de mala calidad (no transferibles), se observaron con marcada degeneración, masa celular pequeña, retraso en el desarrollo, abundantes desechos celulares y blastómeros extruídos, además de presentar color oscuro (figura 1-1-c).

##### ***EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES POR MICROSCOPIA DE LUZ***

Una vez hechos los primeros cortes finos se realizó la observación por microscopía de luz. Encontrándose un 25.6% (20) de embriones de buena calidad, 32.0% (25) regulares y 42.3% (33) de mala calidad (cuadro 1)

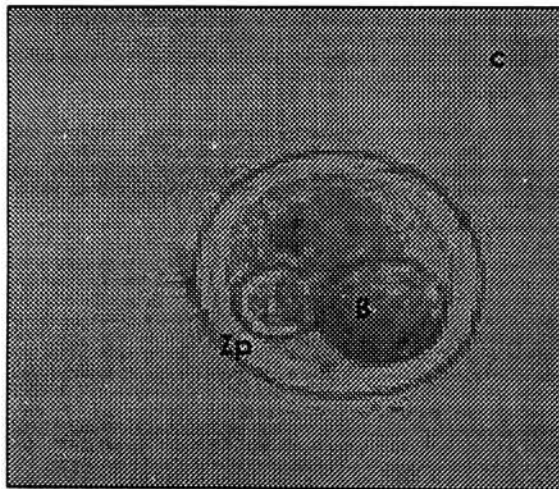
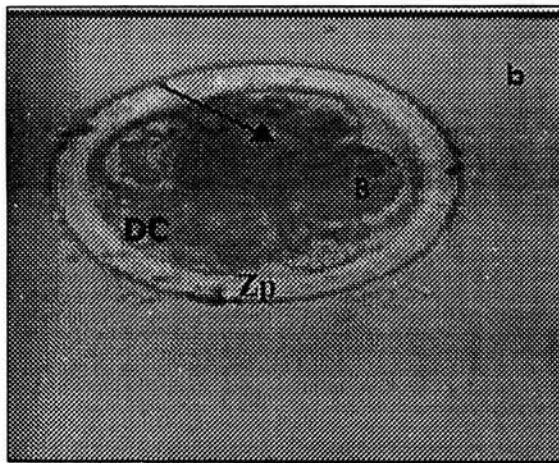
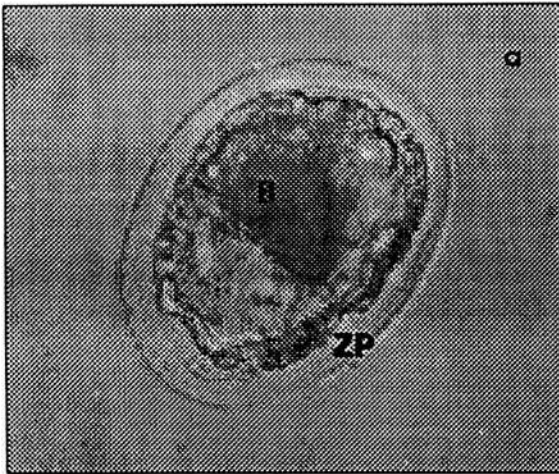
En cuanto a las características morfológicas, los embriones de buena calidad, se observaron esféricos y simétricos, con células de tamaño uniforme, blastómeros bien definidos sin o con muy pocas vesículas blancas y sin células extruídas. Dentro de los blastómeros fue posible distinguir fácilmente los núcleos y no se encontraron daños en la zona pelúcida (figura 1-1-D)

La figura 1-1-E corresponde a un embrión que se clasificó de calidad regular. Pudo notarse la presencia de espacios sin estructuras en los blastómeros, las vesículas blancas se apreciaron en mayor cantidades que los

Calidad de embriones	Buena	Regular	Mala	Total de Embriones
Microscopio estereoscópico	40 (51.2%)	19 (24.3%)	19 (24.3%)	78
Microscopio Luz	20 (25.6%)	25 (32.0%)	33 (42.3%)	78
Microscopio Electrónico	19 (24.3%)	23 (29.4%)	36 (46.1%)	78

CUADRO 1.- Porcentajes de embriones de las diferentes categorías evaluados por los tres métodos.

### Microscopio Esterescópico



### Microscopio de Luz

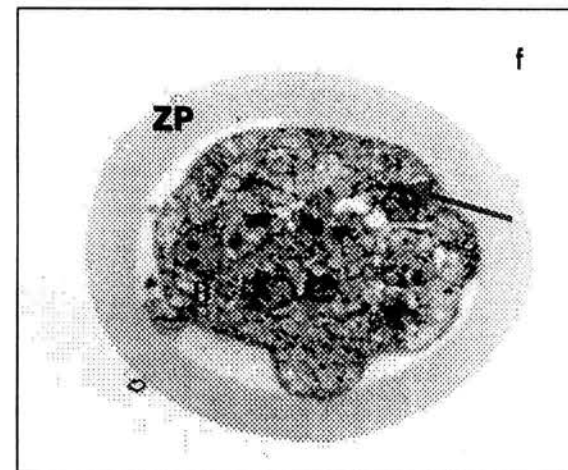
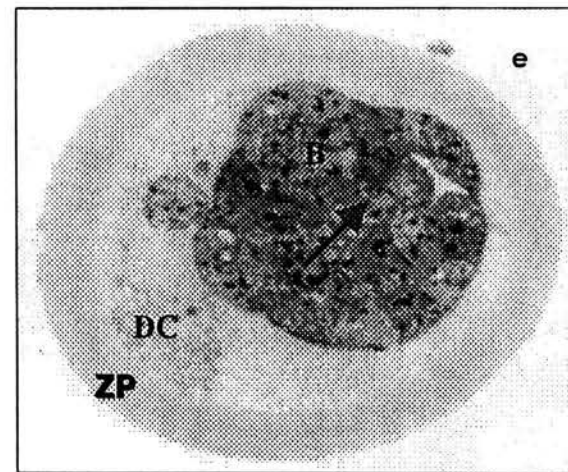
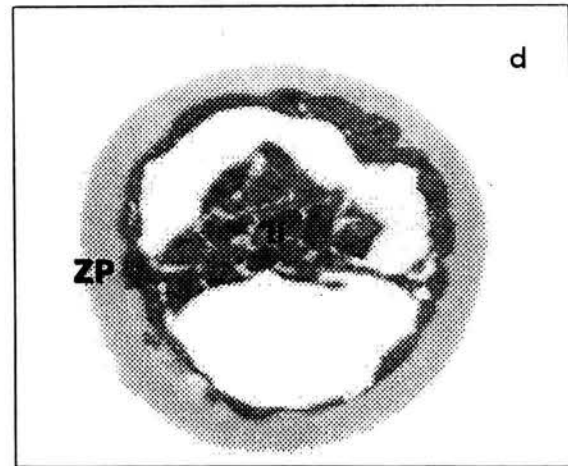


Fig 1. Embriones bovinos de diferentes calidades: A -Buena, B-Regular; C Mala calidad; D Buena, blastómeros bien delimitados, E-Regular, blastómeros con aumento en el número de vesículas blancas; F Mala calidad, blastómeros muy separados, de diferentes tamaños, numerosos blastómeros extruidos y vesículas blancas. Zp=zona pelúcida B=blastómeros flechas- vesículas lisosomales DC- Detritus celulares.

embriones del grupo anterior. Los blastómeros se observaron bien definidos, con cohesión entre ellos y con núcleos evidentes.

Finalmente, en los embriones clasificados como de mala calidad, resalta la presencia de blastómeros muy separados entre sí y de varios tamaños, además de numerosos blastómeros extruídos, poca definición de los núcleos, grandes espacios de color sólido (citoplasma) sin estructuras, abundantes vesículas blancas. No se observan defectos en la zona pelúcida (figura 1-1-E)

### ***EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA***

En cuanto a la evaluación por microscopía electrónica, se observó un 24.3% (19) de embriones de buena calidad, 29.4% (23) regulares y 46.1% (36) de mala calidad (cuadro 1). Entre las características ultraestructurales de los embriones que por éste método fueron clasificados como de buena calidad, resaltan blastómeros bien delimitados, presencia de núcleos con cromatina densa y bien localizada, algunos presentaron evidencias de haber iniciado la división celular. Igualmente, existieron vesículas lipídicas de forma circular, no muy abundantes. Las mitocondrias eran de forma circular y/o alargadas, observándose cristales mitocondriales de diversas formas y longitudes, estas se ubican cerca del núcleo. En el citoplasma, los lisosomas poco abundantes se observaron como vesículas de formas irregulares, con membranas limitrofes que en su interior contenían aglomeraciones de gránulos de diversas formas, que eran detritus celular (fig 2-1). Al evaluarse estos embriones con mayor aumento (fig 3-1), pudieron observarse las uniones celulares (desmosomas) como dos placas electrodensas constituidas por filamentos citoplasmáticos delgados. El citoesqueleto se encontró bien desarrollado, teniendo la apariencia de filamentos finos que se propagan a todo lo ancho del blastómero. También pudieron visualizarse los ribosomas como un puntillado obscuro.

En la figura 4-1, se muestra un embrión clasificado como de calidad regular. Los blastómeros se observan bien delimitados por su membrana citoplasmática, núcleos con cromatina densa y bien localizada, con indicios de haberse iniciado la división celular. En el citoplasma hay una mayor cantidad de lisosomas, así como vesículas lipídicas, algunas de las mitocondrias

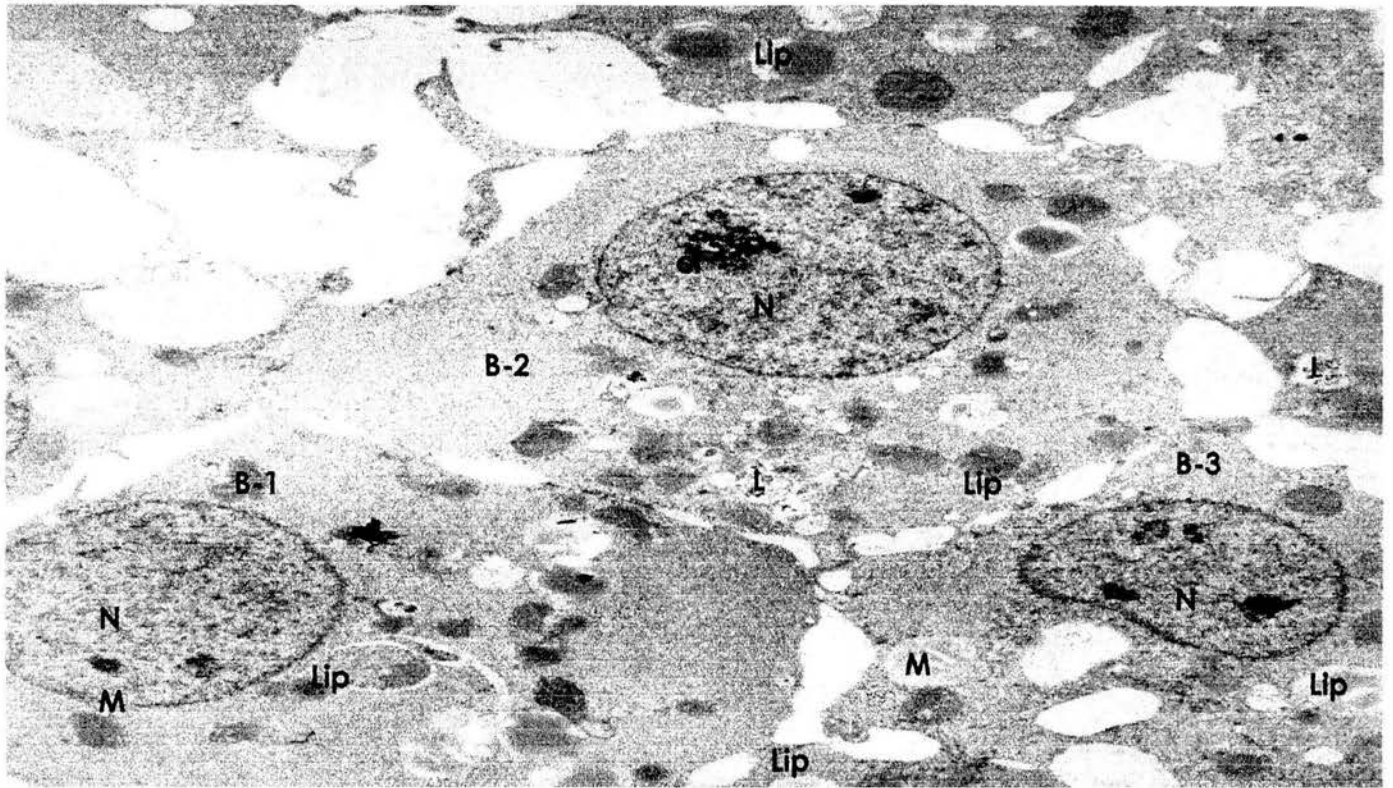


Fig 2-1. Micrografía electrónica que muestra un embrión de buena calidad. Se observan tres blastómeros (B) bien delimitados con pocas vesículas lipídicas (lip) y mitocondrias redondeadas y alargadas (M).  
 N= núcleo, Cr= cromatina, L= lisosomas . 2500X

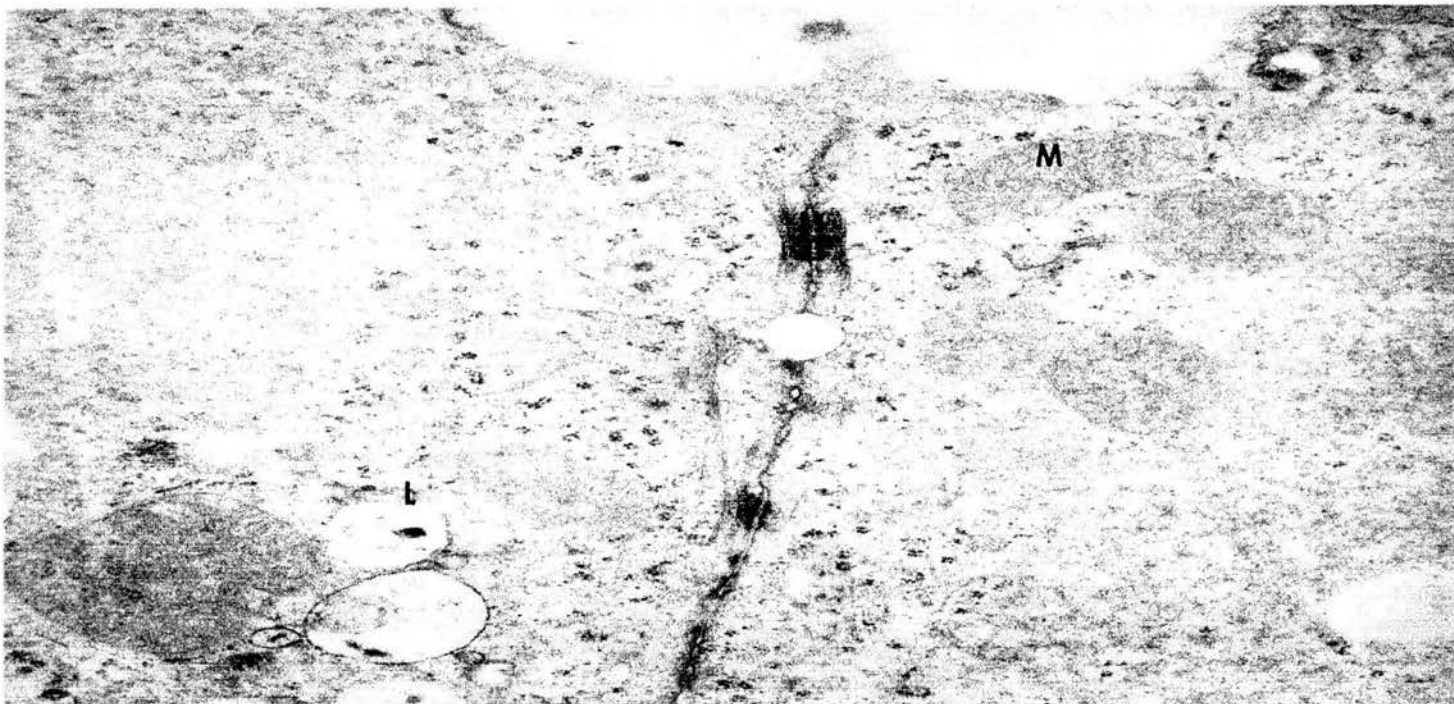


Figura 3-1. Aumento a 12000X del mismo embrión mostrado en la Fig. 2-1. Se detalla la presencia de desmosomas (D), los cuales se observan como estructuras electrodensas. La presencia de ribosomas (R) y mitocondrias (M) elongadas y bien definidas es evidente.

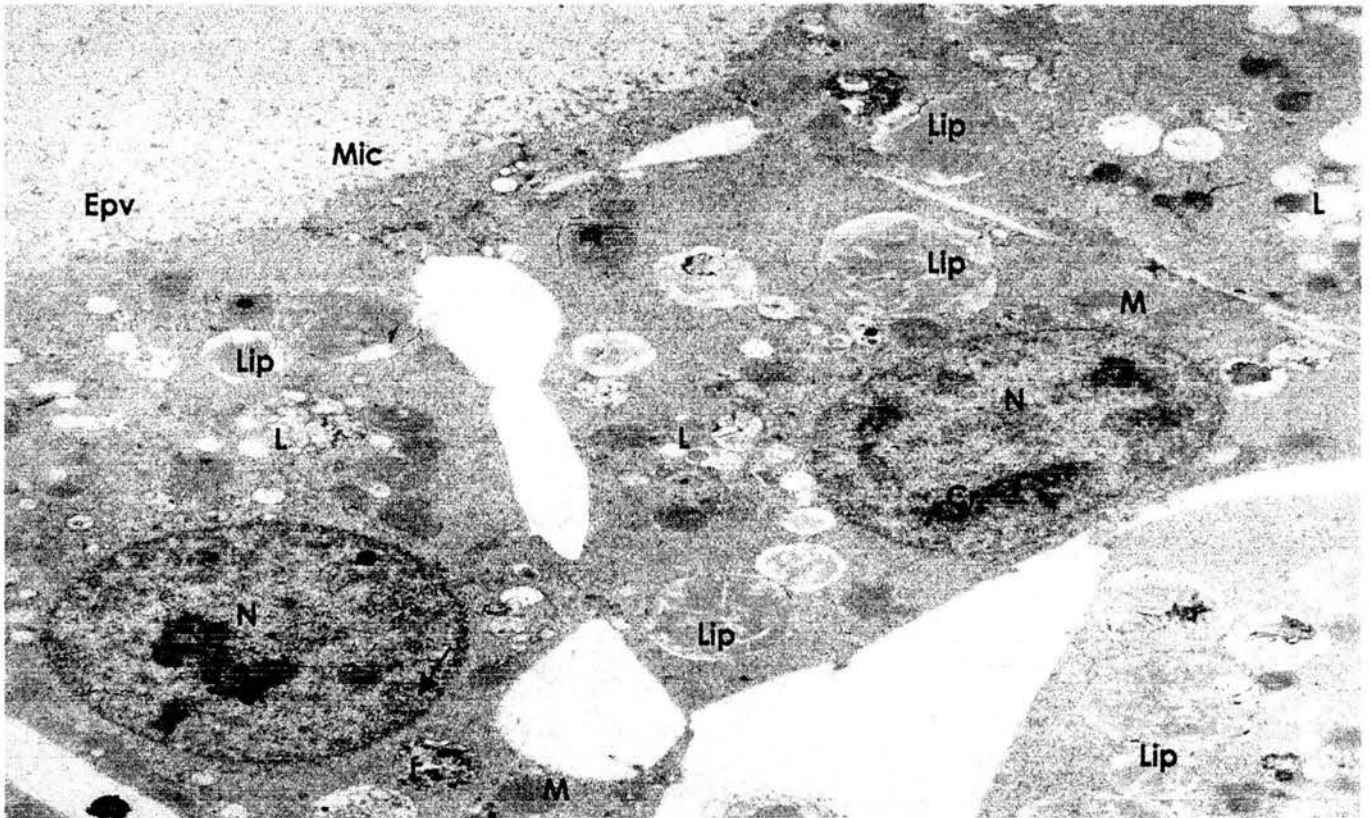
presentaron daños en su estructura. Así mismo, se evidenciaron blastómeros fagocitando células degeneradas lo que podría ser un indicio de muerte celular programada (apoptosis).

En los embriones clasificados como de mala calidad, no existió una clara delimitación entre los blastómeros, ya que en muchas ocasiones perdieron sus membranas citoplasmáticas y se fusionaron, teniendo la apariencia de un blastómero con dos núcleos, además se encontraban rodeados por abundantes lisosomas. También, fue común observar espacios en el citoplasma, que no tenían organelos y cuando se comparó con los de buena calidad, se observó una disminución en la cantidad y el tamaño de las microvellosidades. Las vesículas lipídicas fueron de diversos tamaños, muy abundantes y casi siempre asociadas con los lisosomas. La mitocondrias perdieron definición. En muchas ocasiones se observan abundantes blastómeros con actividad fagocítica, igual que en el grupo anterior (figura 5-1).

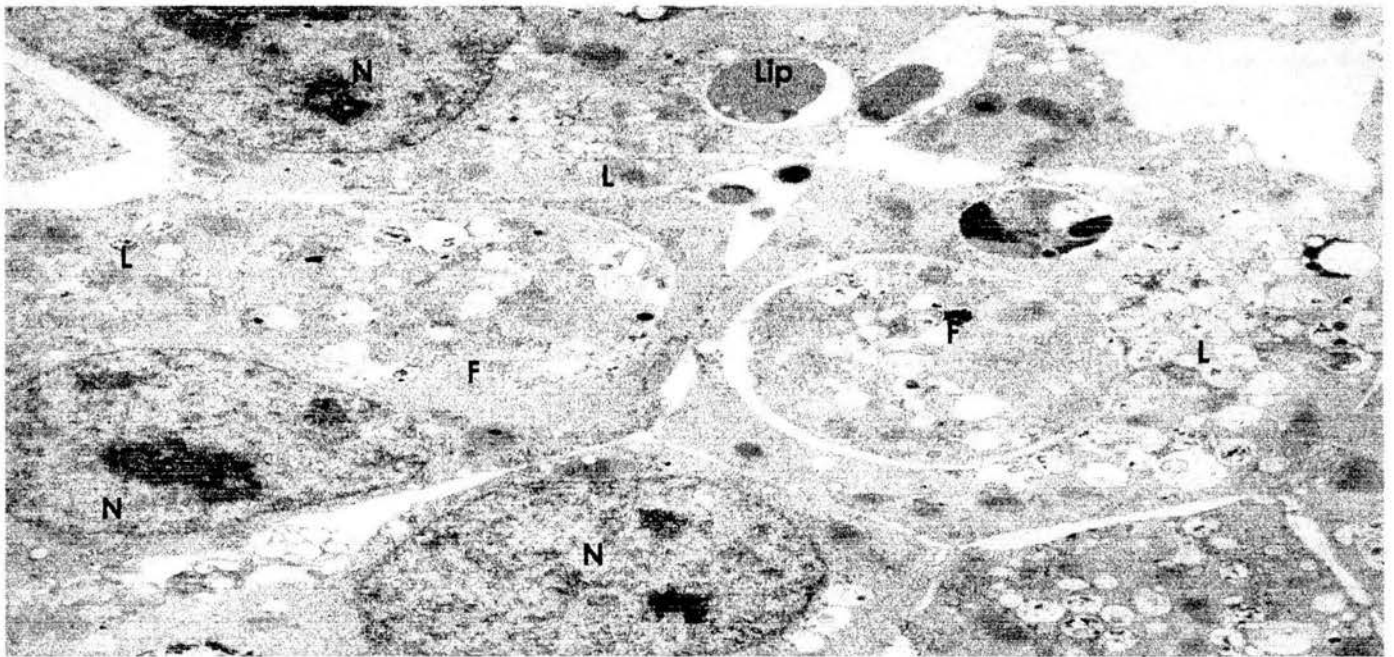
### ***COMPARACIONES ENTRE LAS EVALUACIONES***

En el cuadro 1, se presentan los porcentajes de los embriones considerados en las diferentes categorías al evaluarse mediante los tres diferentes métodos. Como puede apreciarse los embriones que se clasificaron como de buena calidad en el momento de la recolección, van disminuyendo ya que inicialmente son un 51.2% cuando se observaron en fresco y finalmente con microscopía electrónica sólo son un 24.3%. En el caso de los embriones regulares, en la evaluación en fresco se tuvieron 24.3%, aumentando a 32.4% con la observación en fijo, pero finalmente este porcentaje se reduce ligeramente con la microscopía electrónica a 29.4%. En los clasificados de mala calidad, en fresco, se observó un 24.3%, aumentando los porcentajes en las observaciones en fijo (42.3%), y con microscopía electrónica (46.1%).

Es importante resaltar, que las variaciones entre los diferentes métodos de observación y clasificación parecen aleatorias, ya que no presentan un orden específico, puesto que no solo hay cambios de embriones clasificados como de buena calidad a regulares y de regulares a mala, si no que también pueden ser de mala a regulares y de estos a buena. También se puede



**Fig 4-1.** Micrografía electrónica de un embrión de regular calidad. Se observan dos blastómeros bien delimitados por sus membranas citoplasmáticas. En el citoplasma se localizan abundantes vesículas lipídicas (lip) y lisosomales (L), así como una disminución del número y tamaño de las microvellosidades (Mic). Epv= espacio perivitelino. N= núcleo, Cr= cromatina. 2500X



**Fig 5-1.** Micrografía electrónica de un embrión de mala calidad. Se observa un aumento en el número de fagosomas (F). A este nivel se detecta un proceso de fagocitosis por blastómeros adyacentes, lo cual es indicativo de apoptosis . N= núcleo, L=lisosoma, Lip=lípidos. 2500X

destacar, que un 20% de los embriones que se observaron con características buena calidad en la evaluación en fresco, posteriormente se clasificaron como regulares o malos por microscopía de luz y electrónica. Finalmente, se encontró que, un 27% de los embriones que fueron clasificados como de buena calidad en la evaluación en fresco, por microscopía electrónica tuvieron calificación de regulares o de mala calidad. Mientras que los embriones de mala calidad aumentaron en un 21.8% al hacerse la evaluación por el microscopía electrónica.



#### 4.1.4. DISCUSIÓN

La evaluación de la calidad de los embriones en fresco en el presente trabajo, coincide con los reportados por Shea (1981) quien reporta que los embriones de buena calidad presentan una forma esférica, color ámbar y sin alteraciones de la zona pelúcida, los regulares podrían poseer pequeñas imperfecciones en la zona pelúcida, además de algunos blastómeros extruidos y de detritus celulares y en los de mala calidad se presentan gran cantidad de blastómeros extruidos y en proceso de degeneración así como detritus celulares. En cuanto a la evaluación por microscopía de luz de los cortes semifinos, se encuentran semejanzas con los observados por Albiñ et al. (1990) quienes determinan en blastocisto de buena calidad una clara diferenciación entre células trofoblásticas, células de la masa interna y blastocelo, igualmente observan gran cantidad de uniones intercelulares. En embriones de regular y mala calidad nuestros resultados coinciden con los reportados por Mohr y Trounson (1981), Hyttel *et al.* (1986) sin embargo, estos últimos autores reportaron alteraciones de la zona pelúcida de los embriones de mala calidad lo cual no fue observado en la presente investigación.

El aspecto morfológico de los embriones que se clasificaron como de buena calidad, en la evaluación por microscopía electrónica, coincide con los de otros trabajos (Fléchon y Renard 1978; Hyttel *et al.*, 1986, Mohr y Trounson 1981, Chartrain y Picard 1988, King, *et al.*, 1992) quienes observaron que embriones de buena calidad presentan blastómeros bien delimitados, con núcleos de cromatina densa y bien localizadas, además de pocas vesículas lipídicas.

En el grupo de embriones clasificados como regulares, autores como Hyttel *et al.* (1986), Chartrain y Picard (1988), Shamsudin y Rodriguez-Martinez (1994), los describieron con blastómeros bien delimitados, con núcleos de cromatina densa, mitocondrias de forma redonda y/o alargada, vesículas lipídicas abundantes, así como lisosomales, por lo que empieza a notarse fragmentación celular y fagocitosis de células degeneradas, ambas características indicativas de apoptosis (Betts y King, 2001). En nuestro laboratorio hemos determinado apoptosis por técnica de Tunel en embriones

bovinos de buena, regular y mala calidad, observando la presencia de núcleos y cuerpos apoptóticos en los tres tipos de embriones, sin embargo el número de células con estas características apoptóticas con relación al número de células viables es mucho mayor en embriones de regular y mala calidad. Estos resultados preliminares tienden a apoyar las evidencias ultraestructurales encontradas. Igualmente los autores arriba mencionados, han descrito en embriones regulares, blastómeros con espacios donde no se observa ningún aparato celular y menor número de las uniones entre los blastómeros, dando la apariencia de estar separados. Las microvellosidades son más cortas y menos abundantes, lo cual podría causar alteración en los procesos de nutrición del embrión. Estas características indican que de ser transferidos podrían lograr una gestación, a pesar de que algunos de ellos serían desechados en la evaluación en fresco siguiendo el criterio de que solamente se transfieren los embriones clasificados como buenos.

Los embriones que se clasificaron como de mala calidad presentaron como características específicas, blastómeros poco delimitados, fagocitosis muy evidente, llegando a desaparecer la membrana nuclear (Hyttel *et al.*, 1986; Chartrain y Picard, 1988; Shamsusddin y Rodriguez-Martinez, 1994). Al igual que en los trabajos antes mencionados, se utilizó Karnovsky para el proceso de fijación de los embriones, debido a que ha sido determinado como uno de los mejores fijadores por ser una mezcla de formaldehído y glutaraldehído, en donde el primero penetra rápidamente estabilizando las estructuras celulares las cuales son subsecuentemente mejor conservadas por el glutaraldehído (Karnovsky, 1965). En el presente trabajo se encontró, que la evaluación de los embriones por microscopía de luz y electrónica (embriones fijados) ayuda a corroborar que los embriones clasificados como de mala calidad por microscopía estereoscópica realmente poseen características morfológicas que así lo corroboran, además de que muchos embriones que fueron clasificados como de buena calidad, por este método mostraron características de embriones en proceso de degeneración.

En cuanto a la comparación entre las observaciones en fresco y las evaluaciones tanto de cortes semifinos (microscopía de luz) como ultrafinos

(microscopía electrónica) se encontraron algunas diferencias. Esto puede explicarse debido a la dificultad que implica una evaluación en fresco, ya que la resolución del microscopio estereoscópico no permite distinguir muchas estructuras que podrían proporcionar una información valiosa. Además, la clasificación depende de la experiencia del observador, lo que lo convierte en algo subjetivo. Los resultados encontrados en este estudio, en cuanto a la observación de los embriones en fresco, concuerdan con el estudio realizado por Farin *et al.* (1995), en el cual varios observadores experimentados, evaluaron 40 embriones con diferentes estados de desarrollo y grados de degeneración estando de acuerdo sólo en el 68.5% de los diagnósticos, existiendo mayor dificultad para diferenciar los embriones de buena y regular calidad.

En el presente estudio, existieron embriones clasificados como de buena calidad en la evaluación en fresco, que posteriormente en las evaluaciones por microscopía de luz y electrónica se catalogaron como malos por lo que cuando éste tipo de embriones se transfieren disminuyen notablemente sus oportunidades de gestar. Este hecho podría explicar por que en el estudio de Chartrain y Picard (1988) se observaron tasas de preñez de 31% en los embriones considerados de mala calidad, y el 37% de los embriones considerados como de buena calidad no llegaron a producir gestaciones. Estas mismas observaciones, fueron expuestas por Elsdén *et al.*, (1978) quienes encontraron que los embriones calificados de mala calidad por microscopía de luz, tuvieron un 12% de gestación cuando se transfirieron. Esta situación se agrava en el trópico, en donde se transfieren gran cantidad de embriones de regular calidad debido a el bajo porcentaje de embriones que se colectan, esto indudablemente tiene una repercusión negativa sobre las tasas de gestación, las cuales según Galina y Arthur (1990) se sitúan en el trópico en un 30%. Basándose en estos resultados se puede concluir, que la evaluación de los embriones por medio de la técnica de microscopía estereoscópica fue muy subjetiva, ya que muchos embriones que se clasificaron por esta técnica como de buena calidad al ser evaluados por microscopía de luz y electrónica presentan características de embriones en estado de degeneración. Estos embriones generalmente se transfieren lo que podría ser una causa del bajo

porcentaje de fertilidad observado en los programas de transferencias de embriones. De manera que se hace necesario, encontrar técnicas alternas y no invasivas para evaluar la viabilidad embrionaria previa a la transferencia, como herramienta para mejorar los programas de transferencia de embriones y de esta manera incrementar su valor comercial.

#### 4.1.5. LITERATURA CITADA

1. Albiñ A, Rodríguez-Martínez H, Gustafsson H. Morphology of day 7 bovine demi-embryo during *in vitro* reorganization. *Acta Anatomical*. 1990, 138:42-49.
2. Betts D and King W. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Therio*. 2001;55:171-191.
3. Boland M, Crosby T, Gordon I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Therio*: 1978; 10: 175-181.
4. Chartrain I and Picard L. Ultrastructural Analysis of bovine embryos at days 6 to 8: Correlation with embryo quality. *Therio*. 1988; 29:236.
5. Elsden R, Nelson L, Seidel G. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Therio*. 1978;9:17-26.
6. Farin P, Britt J, Sahw D, Slenning B. Agreement among evaluators of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Therio*. 1995; 44:339-349.
7. Fléchon J and Renard J. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. and Fert*. 1978; 53: 9-12.
8. Galina C, Arthur G. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 5. Fertilization and Pregnancy. *Anim. Breed. Abstrac*. 1990 c; 58: 805-813
9. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática Koeppen. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. México, 15-19. 1973.
10. Goulding D, Williams D, Roche J, Boland M. Superovulation in heifers using either pregnant mare's serum gonadotropin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Therio*. 1991;36:949-958.
11. Greve T, Callesen H, Hyttel P, Assey R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Therio*. 1995; 43: 41-50
12. Hyttel P, Lehn-jensen T, Greve T. Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by a two-step freezing method. *Acta anatomical*. 1986, 125:27-31.
13. Kafí M and McGowan M. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 1997, 48: 137-157.
14. Karnovsky M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol*. 1965, 27:137.

15. King W, Shepherd D, Plante L, Powell R, Looney C, Barnes F. An ultrastructural study of bovine embryos produced by nuclear transfer. *Therio.* 1992; 37: 238.
16. Linder G, Wrigth R. Bovine embryo morphology and evaluation. *Therio.* 1983; 29:407-416.
17. Merchant H, Chang M. An electron Microscopy Study of mouse eggs matured *in vivo* and *in vitro*. *Anatomic. Rec.* 1971; 171:31-38.
18. Mohr L and Trounson A. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 1981; 25: 1009-1025.
19. Pullan N. Condition scoring in Fulani cattle. *Tropic. Anim. Health* 1978, 10. 118-120.
20. Reichenbach H, Liebrich J, Berg U, Berm G. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. and Fert.* 1992; 95: 636-370.
21. Rondeau M, Guay P, Goff A, Cooke G. Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. *Therio.* 1995; 44:351-366.
22. Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers J, Sulon J, Hansen H. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Therio.* 1995 :527-539.
23. Shea B. Evaluating the bovine embryo. *Therio.* 1981; 15: 31-35.
24. Silva A and Machado E. Eficacia de diferentes productos comerciales superovulatorios en programa de T.E em um rebanho Nelore/Nelore mocho. *Arquivos da Faculdade de Veterinària UFRGS.* 1996: 24-26.
25. Shamusddin M y Rodriguez-Martinez H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Vet. Med.* 1994, 41: 307-316.

## 4.2. Experimento 2.

### EVIDENCIA DE DAÑO CELULAR UTILIZANDO LA TÉCNICA DE TUNEL EN EMBRIONES BOVINOS CRIOPRESERVADOS EN CONDICIONES TROPICALES

Márquez-Alvarado YC<sup>1</sup>, Galina CS<sup>1</sup>, Castilla B<sup>2</sup>, León H<sup>1</sup>, Moreno-Mendoza

N<sup>3</sup>.

1. Departamento de Reproducción, FMVZ, UNAM
2. Fideicomiso para el Mejoramiento Genético de la Ganadería del Estado de Chiapas, México, México
3. Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIB, UNAM

### RESUMEN

El propósito del presente estudio fue evaluar la calidad de embriones bovinos criopreservados durante diferentes años en Chiapas, México. Los embriones fueron obtenidos del FIMEGEN, el cual es un Instituto gubernamental dedicado a promover la transferencia de embriones entre granjas dedicadas a la explotación de doble propósito. Para cumplir con este objetivo, se evaluaron 43 embriones almacenados durante los años 1988, 1989, 2000 y 2002 a través de la técnica de Tunel para detectar muerte celular programada (apoptosis). Once embriones procesados en fresco fueron usados como testigo. El análisis estadístico de los resultados se realizó por análisis de varianza seguido por una comparación de medias con la prueba de Tukey para comparar embriones almacenados durante diferentes años y "t" de Student entre los embriones frescos y congelados. Los resultados mostraron que embriones con menor tiempo de almacenamiento presentan menor número de células Tunel positivo ( $p < 0.001$ ) comparada con embriones almacenados por largos periodos de tiempo. Al comparar el número de células apoptóticas entre

embriones frescos y congelados, se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el número de células Tunel positivas en embriones criopreservados. Resultados que fueron corroborados por evaluación ultraestructural. Los presentes resultados sugieren que el daño celular observado en células embrionarias podría deberse a la deficiente evaluación de los embriones después del lavado, lo cual podría afectar los porcentajes de preñez en los programas de transferencia de embriones. Otra explicación a los bajos porcentajes de preñez reportados en el trópico, pudiese deberse a daños irreversibles causados por fallas durante el proceso de almacenamiento en estos centros gubernamentales los cuales manejan grandes volúmenes de embriones.



#### 4.2.1. INTRODUCCIÓN

En las regiones tropicales del mundo, la producción de embriones F1 (*Bos Taurus x Bos Indicus*) para su distribución entre pequeños productores ha sido el objetivo perseguido por varios investigadores. El principal propósito ha sido mejorar los programas de producción de leche y lograr animales resistentes al medio, para incrementar la capacidad productiva y reproductiva de los bovinos en esta zona (Cunningham, 1989, Madalena *et al.*, 1989). En México, así como en otros países en vías de desarrollo, se han establecido políticas gubernamentales con este propósito. Programas como el del Fideicomiso para el Mejoramiento Genético de la Ganadería Tropical (FIMEGEN) que opera en el estado de Chiapas, fueron creados con el fin de promover la técnica de transferencia de embriones (TE) entre productores dedicados a la explotación de animales doble propósito. En este programa se producen embriones, que son almacenados en algunos casos por largos periodos de tiempo para su posterior implantación entre productores de la región. Hay que destacar que los embriones producidos a escala industrial tienen la desventaja de estar sujetos a una variedad de criterios de evaluación cuando son seleccionados para el proceso de criopreservación, a pesar de que ha sido establecido por varios investigadores que la evaluación del embrión es una fuente importante de error (Linder y Wright, 1983). Sobre la base de estos antecedentes, se ha demostrado usando técnicas invasivas para evaluar embriones, que células clasificados por clínicos experimentados como viables, poseen características de un embrión en estado de degeneración. Estas evidencias fueron confirmadas recientemente bajo condiciones tropicales donde se encontró que 30% de los embriones que se clasificaron como buenos muestran características de estados degenerativos bajo el microscopio electrónico (Aguilar *et al.*, 2002).

Otra causa potencial de error en la técnica de TE, es el hecho de que los embriones son clasificados rutinariamente por examen estereoscopio de rutina antes de ser congelados y la calidad del embrión no se vuelven a evaluar durante el almacenamiento. Considerando que uno de los puntos más importante en la TE es la evaluación de la calidad del embrión, esta práctica

puede conducir a la posibilidad de que se transfieran embriones con poca posibilidad de desarrollo, y en consecuencia de generar gestaciones. Igualmente, es importante pensar que la manipulación y cuidados de los embriones almacenado es un punto crítico para la viabilidad de las células embrionarias. Por lo tanto, debe de ser considerado realizar una evaluación del efecto de tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad de los embriones.

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la calidad de embriones bovinos criopreservados en diferentes años, mediante el grado de apoptosis (muerte celular programada), usando la técnica de Tunel y microscopia electrónica.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar el grado de apoptosis usando la técnica de Tunel en embriones bovinos almacenados por el FIMEGEN durante diferentes años.
2. Comparar el número de células Tunel positivo entre embriones congelados y procesados en fresco.

#### 4.2.2. MATERIAL Y METODOS

##### ***Embriones:***

Se analizaron cuarenta y tres embriones F1 (Holstein x Gyr), congelados en 1988, 1989, 2000 y 2002 por la técnica de Tunel, para detectar muerte celular programada (apoptosis). Se contó con un grupo de 11 embriones para ser procesados en fresco y de esta manera tener un testigo. Los embriones fueron colectados y congelados por el Fideicomiso para el Mejoramiento Genético del la Ganadería Tropical del estado de Chiapas, México (FIMEGEN). El clima del estado de Chiapas se clasifica como trópico húmedo, con precipitaciones de 800-2,500 mm anuales, la temperatura promedio anual es de 24.7°C (García, 1973). Los embriones seleccionados fueron mórulas y blastocistos, clasificados como de buena calidad de acuerdo a los criterios descritos por Linder y Wrigth (1983).

##### ***Colección de Embriones***

Se obtuvieron 11 embriones que se procesaron inmediatamente posterior al lavado, para tener una referencia de los posibles daños producidos debido al almacenamiento por largos periodos. Para este propósito, se seleccionaron de 4 donadoras, las cuales fueron tratados con dos implantes auriculares que contienen 6 mg de Norgestomet, mas una inyección de 5 mg de Valerato de Estradiól y 3 mg de Norgestomet (Syncromate B/Rhone Merieux, México D.F., México) durante 9 días. A partir del séptimo día de retirados los implantes, se aplicaron durante 4 días un total de 240 mg de hormona Foliculo Estimulante (FSH) en dosis decrecientes (Folltropin-V, Vetrepharm Inc., London, Ont., Canada). En el noveno y décimo día se administraron 25 mg de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (Lutalyse/Upjhon, México D.F., México). La detección de celos se hizo en forma continua, iniciándose a las 12 horas posteriores al retiro del implante y se inseminaron los animales artificialmente a las 12 y 24 horas de iniciado el estro. La recolección embrionaria se realizó por medio de lavado uterino, a los 7.5 días posteriores a la primera inseminación.

### ***Congelamiento y Descongelamiento de Embriones:***

Se contó con cuarenta y tres embriones colectados de la misma manera que los del grupo anterior, pero en este caso fueron congelados. De modo que ocho embriones fueron criopreservados en 1988, doce en 1989, once de 2000 y doce de 2002. El proceso de criopreservación se realizó en pajillas con 1.4 M de glicerol (Sigma, St. Louis, Mo, USA), en buffer de fosfato Dulbecco (PBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) usando el procedimiento de 2 pasos de congelación. Primer paso: Inducción de la cristalización reduciendo la temperatura 1°C/min hasta -7°C. Segundo paso: Transferencia a nitrógeno líquido con una reducción de 0.3°C/min hasta -35°C (Leibo,1986). Para descongelar los embriones, se colocaron las pajillas en agua a 37°C, removiendo el glicerol y fueron equilibrados los embriones en glucosa 0.5 M y posteriormente colocados en medio de transferencia el cual contenía PBS y 10% de suero fetal bovino.

### ***Técnica de Tunel***

Una vez descongelados los embriones del grupo de criopreservación como se indicó anteriormente y de obtenido los embriones para ser procesados en fresco, se determinó el grado de apoptosis por la técnica de Tunel (Roche Diagnostics kit, Indianapolis, IN, USA). Los embriones fueron brevemente fijados en paraformaldehído al 4% (Aldrich Chemicals Company Inc., USA) en PBS, pH 7.4 por 30 minutos a temperatura ambiente y luego transportados en PBS bajo refrigeración. Una vez en el laboratorio fueron permeabilizados con Triton X-100 al 0,1% (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), lavados en PBS e incubados a 37° C por 1 hora con 50 µl de solución de Tunel (Fluoresceína-dUTP y dinucleotidil transferasa tdt). De esta manera, es posible detectar la fragmentación de las cadenas de DNA marcando el extremo 3'-OH utilizando un nucleótidos marcado (fluoresceína-dUTP), mientras que la enzima tdt realiza la transferencia de los nucleótidos. Esta transferencia es analizada con microscopio confocal LSM 5 Pascal, Zeiss (Argon-Krypton laser), con filtro BP 450-490. Los controles positivos fueron incubados durante 10 minutos con la enzima Dnasa (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) y posteriormente tratados con solución Tunel. En el caso del control negativo sólo fue tratado con

Fluoresceína-dUTP. Para corroborar el índice apoptótico, tres embriones frescos y congelados fueron procesados para su evaluación por microscopía electrónica siguiendo el procedimiento descrito por Aguilar et al., 2002

### ***Análisis Estadístico***

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó análisis de varianza para el caso de embriones criopreservados en diferentes años, las medias de estos grupos fueron comparadas por la prueba de Tukey. El número de núcleos marcados en cada embrión se evaluó por cuantificación de núcleos fluorescentes con el procesador de imágenes Scion Image. Para comparar el índice de apoptosis entre embriones frescos y congelados durante el 2002 se realizó una prueba de "t" de Student, utilizando un nivel de significancia del 5%. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS (Statistica Package for Social Science) versión 10.0.

### 4.2.3. RESULTADOS

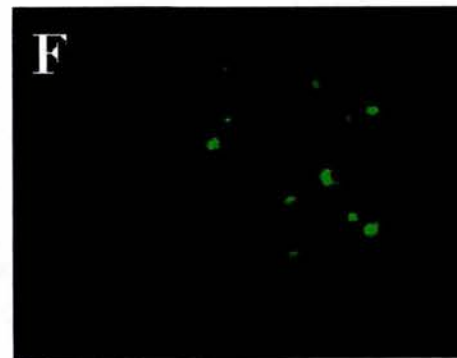
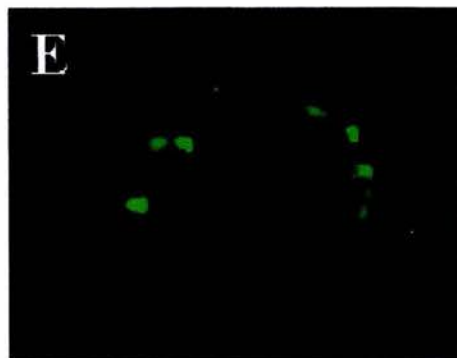
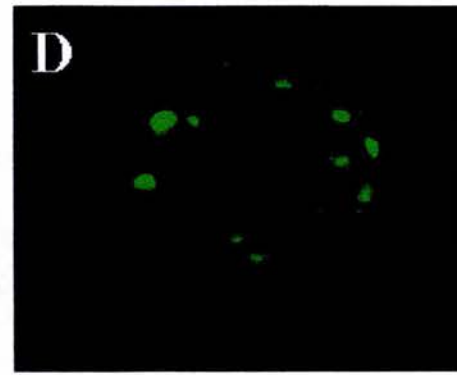
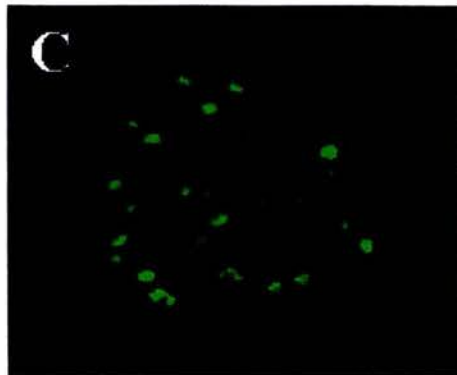
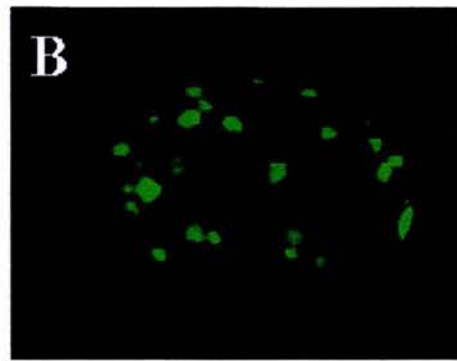
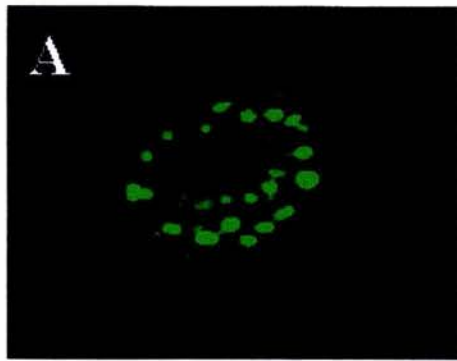
#### ***EVALUACIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS CON MICROSCOPIA CONFOCAL***

Tanto en embriones procesados en fresco como en los congelados en los años 1988, 1989, 2000 y 2002, se identificaron células Tunel -positivo, luego de ser analizadas al microscopio confocal. En la Fig. 1-2 se muestra un embrión en cada una de las diferentes condiciones.

Cuando la fragmentación del DNA (apoptosis) es inducida con DNasa, todos los embriones presentaron una distribución uniforme de células Tunel-positivo (Fig. 1-2-A), demostrando de esta manera que este método funciona de manera apropiada para detectar fragmentación celular (controles positivos). En contraste, ninguno de los núcleos fue marcado en embriones incubados con fluoresceína-dUTP sin la enzima tdt (Control negativo; Fig. 1-2-G). En embriones criopreservados durante diferentes años, se evidenciaron variaciones en el número de células Tunel-positivo cuando fueron analizados en el microscopio confocal. Específicamente, los embriones almacenados por un periodo de tiempo mayor (1988, 1989), presentaron abundantes células Tunel-positivo (Fig. 1-2-B y 1-2-C). En contraste, embriones congelados en años más recientes (2000 y 2002) mostraron una disminución considerablemente en el número de células Tunel positivo (Fig. 1-2-D, 1-2-E)

En el caso de los embriones colectados en el 2002 y procesados inmediatamente después del lavado, se detectaron células Tunel-positivo (fig. 1-2-F), sin embargo, al realizar el análisis en el microscopio confocal y comparar con embriones criopreservados en el mismo año, se encontró que los embriones procesados posterior al lavado poseían una disminución apreciable en el número de células con estas características.

**Fig. 1-2.** Embriones Criopreservados en diferentes años en los cuales se muestran el número de células Tunel Positivo. (A) Control Positivo en donde la fragmentación del DNA fue inducida con la enzima Dnasa. El número de células Tunel positivo fue diferente en embriones congelados en 1988, 1989, 2000 y 2002. (B,C,D,E respectivamente). Embrión procesado inmediatamente después de su obtención (F). (G= Control negativo incubado sólo con solución label. (H) Análisis en microscopia de luz del mismo embrión mostrado en la Fig. E, se observa la zona pelúcida.





## ***NÚMERO DE CÉLULAS TUNEL-POSITIVO EN EMBRIONES CRIOPRESERVADOS***

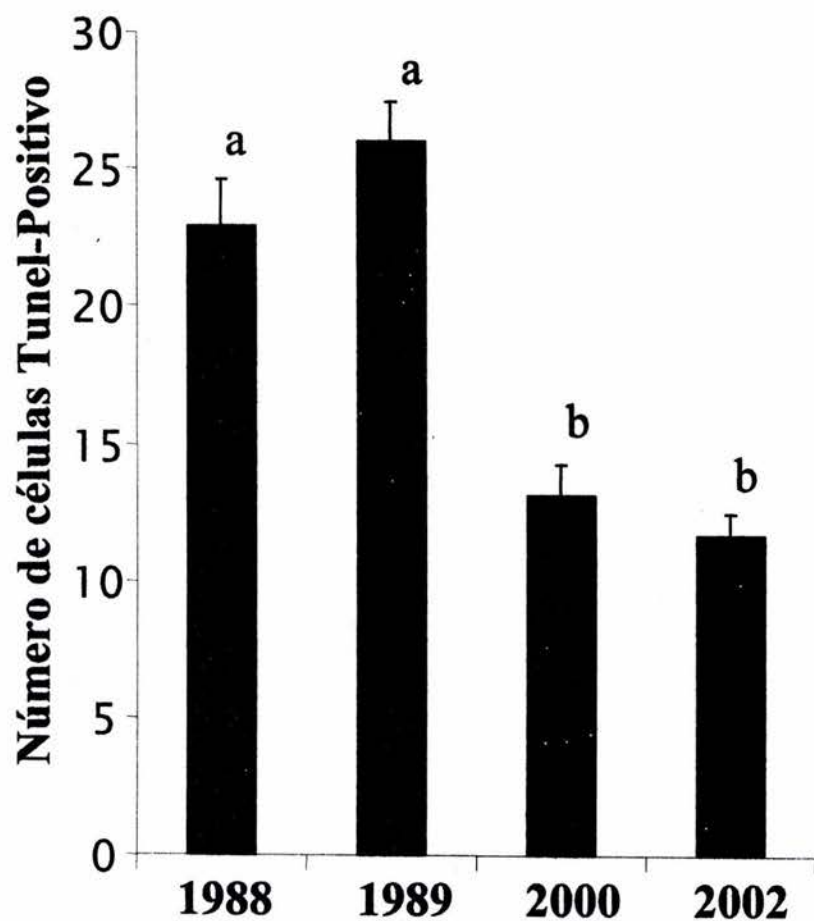
Un total de cuarenta y tres embriones bovinos criopreservados durante diferentes años fueron semi-cuantitativamente analizados para detectar la presencia de fragmentación del DNA (células Tunel-positivo) usando la técnica de Tunel. Células con núcleos marcados fueron observadas en todos los grupos de embriones, el número varió de acuerdo al tiempo de almacenamiento (100% de los embriones mostraron al menos una célula con fragmentación del DNA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de células Tunel-positivo al comparar embriones congelados en 1988 ( $22.91 \pm 1.94$ ) y 1989 ( $21.66 \pm 2.00$ ) ni entre embriones criopreservados en el 2000 ( $13.14 \pm 1.14$ ) y 2002 ( $11.7 \pm 0.8$ ). Sin embargo, se encontraron diferencias ( $p < 0.001$ ) al comparar embriones congelados en 2000 y 2002 con respecto al los criopreservados durante 1988 y 1989 (Fig. 2-2). Estos resultados sugieren un importante incremento en el número de células Tunel positivo cuando los embriones son almacenados por largos periodos de tiempo.

## ***COMPARACIÓN DEL GRADO DE APOPTOSIS ENTRE EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS:***

Un total de 11 embriones fueron procesados por la técnica de Tunel posterior al lavado. Estos fueron colectados en el 2002 y comparados con embriones congelados en el mismo año y almacenados solo durante tres meses (Fig. 3-2). Los embriones que no se congelaron presentaron menor número de células Tunel positivo ( $7.09 \pm 0.54$ ) cuando se compara con embriones congelados ( $11.7 \pm 0.8$ ). Las diferencia encontradas fueron significativas ( $p < 0.05$ ).

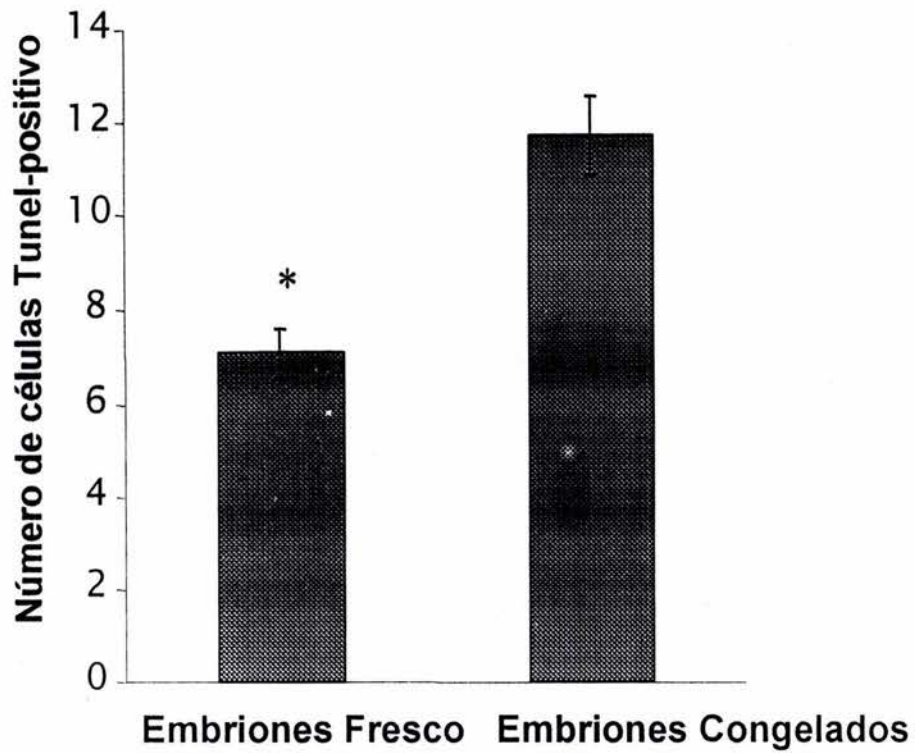
## ***EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA***

Para corroborar la fragmentación del ADN, tres embriones frescos y tres embriones criopreservados fueron analizados en el microscopio electrónico.



**Fig. 2-2. NÚMERO DE CÉLULAS TUNEL-POSITIVO EN EMBRIONES CRIOPRESERVADOS**

Los valores representan la  $X \pm ES$  de cada grupo  
ab ( $p < 0.001$ )



**Fig. 3-2. COMPARACIÓN DEL GRADO DE APOPTOSIS ENTRE EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS**

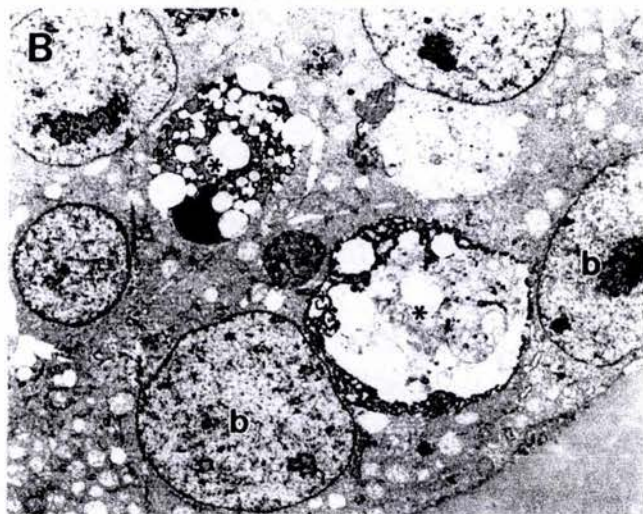
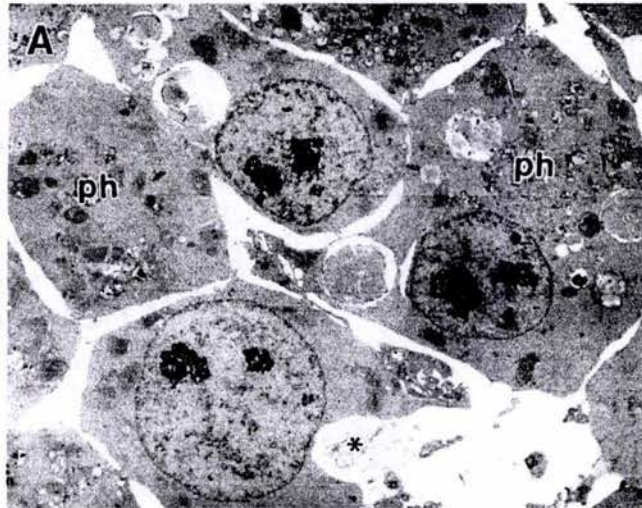
Los valores representan el  $X \pm ES$  de cada grupo

\* $P < 0.05$

La fig. 4-2-A representa un embrión fresco, procesado inmediatamente después del lavado. En este caso, algunos blastómeros se observaron bien delimitados, núcleos con heterocromatina evidente. Igualmente, están presentes algunas vesículas lipídicas, mitocondrias redondeadas y abundante retículo endoplásmico rugoso. Sin embargo, algunos blastómeros se encuentran fagocitando células degeneradas, lo cual es un signo de apoptosis.

En embriones procesados luego de ser descongelados, las células con características de apoptosis fueron más evidentes. Algunos blastómeros perdieron de la continuidad de la membrana citoplasmática y se fusionaron con otros blastómeros. También, se observaron espacios en el citoplasma que corresponden a células muertas y fagocitadas. En el mismo embrión, se observaron blastómeros bien definidos con mitocondrias redondeadas y núcleos con heterocromatina (Fig. 4-2-B).

**Fig. 4-2.** (A) Micrografía electrónica donde se muestran blastómeros de un embrión fresco. Se observan invaginaciones de la membrana citoplasmática lo cual probablemente representa el primer estado de formación de un fagosoma. (\*). Fagosoma envuelto por un blastómero adyacente lo que indica proceso de fagocitosis (ph). (B) Esta figura muestra una micrografía electrónica de un embrión bovino almacenado durante tres meses. Se observa gran cantidad de vesículas (\*) dentro del citoplasma de algunos blastómeros(b). 2500x.



#### 4.2.4. DISCUSIÓN

Actualmente la criopreservación forma parte integral de los programas de transferencia de embriones (TE) y fertilización *in-vitro* en bovinos. Sin embargo, se conoce que durante el proceso de congelamiento y descongelamiento se produce una disminución en la viabilidad del embrión, lo que se atribuye a daños físicos y químicos inducidos durante el proceso (Baguisi *et al.*, 2000; Overstrom, 1996). Estos daños pueden ser consecuencia de la acción tóxica de los crioprotectores, los cuales invaden la célula durante el proceso de solidificación. Esta injuria a la célula puede llevar a la muerte celular, afectando la viabilidad y crecimiento del embrión (Green y Reed, 1988; Overstrom, 1996). Si este daño ha sido indicado en embriones clasificados como viables de acuerdo a criterios establecidos (Linder y Wright, 1983) y en esta en clasificación puede haber errores del 30% al menos en condiciones tropicales (Aguilar *et al.*, 2002) se puede asumir que probablemente los embriones están siendo congelados cuando sus estructuras celulares han iniciado daños irreversibles, de modo que al descongelarlos, su capacidad de producir una gestación es mínima. Obviamente, es necesario realizar más investigaciones en esta área para discernir si la técnica de clasificación es la adecuada o si el grupo de animales *Bos Indicus* evaluado en este estudio proporciona embriones viables los cuales coincidan con los criterios de evaluación actualmente en uso.

En el presente estudio, usando la técnica de Tunel se observó un incremento significativo en el número de células Tunel positivo en embriones almacenados, los cuales son destinados a ser transferido a los animales de las granjas cercanas al área de influencia de centros gubernamentales dedicados a la diseminación de la técnica de transferencia embrionaria. Este daño celular puede ser debido a que en centros de este tipo, frecuentemente se preparan simultáneamente un gran número de embriones con la finalidad de disminuir los costos de producción. Una desventaja clara podría ser la disparidad que existe entre los técnicos a cargo de clasificar los embriones basado en la microscopía estereoscópica. En efecto, Farin *et al.* (1995), han demostrado la subjetividad de la evaluación estereoscópica, ya que se ha reportado que

#### 4.2.4. DISCUSIÓN

Actualmente la criopreservación forma parte integral de los programas de transferencia de embriones (TE) y fertilización *in-vitro* en bovinos. Sin embargo, se conoce que durante el proceso de congelamiento y descongelamiento se produce una disminución en la viabilidad del embrión, lo que se atribuye a daños físicos y químicos inducidos durante el proceso (Baguisi *et al.*, 2000; Overstrom, 1996). Estos daños pueden ser consecuencia de la acción tóxica de los crioprotectores, los cuales invaden la célula durante el proceso de solidificación. Esta injuria a la célula puede llevar a la muerte celular, afectando la viabilidad y crecimiento del embrión (Green y Reed, 1988; Overstrom, 1996). Si este daño ha sido indicado en embriones clasificados como viables de acuerdo a criterios establecidos (Linder y Wright, 1983) y en esta en clasificación puede haber errores del 30% al menos en condiciones tropicales (Aguilar *et al.*, 2002) se puede asumir que probablemente los embriones están siendo congelados cuando sus estructuras celulares han iniciado daños irreversibles, de modo que al descongelarlos, su capacidad de producir una gestación es mínima. Obviamente, es necesario realizar más investigaciones en esta área para discernir si la técnica de clasificación es la adecuada o si el grupo de animales *Bos Indicus* evaluado en este estudio proporciona embriones viables los cuales coincidan con los criterios de evaluación actualmente en uso.

En el presente estudio, usando la técnica de Tunel se observó un incremento significativo en el número de células Tunel positivo en embriones almacenados, los cuales son destinados a ser transferido a los animales de las granjas cercanas al área de influencia de centros gubernamentales dedicados a la diseminación de la técnica de transferencia embrionaria. Este daño celular puede ser debido a que en centros de este tipo, frecuentemente se preparan simultáneamente un gran número de embriones con la finalidad de disminuir los costos de producción. Una desventaja clara podría ser la disparidad que existe entre los técnicos a cargo de clasificar los embriones basado en la microscopía estereoscópica. En efecto, Farin *et al.* (1995), han demostrado la subjetividad de la evaluación estereoscópica, ya que se ha reportado que



**Falta página**

**N°** 57

positivo en embriones congelados sólo por tres meses, indicando que la criopreservación *per se* causa daños que comprometen la viabilidad del embrión. Estos resultados esperados, están de acuerdo a los reportados por Haek *et al.* (2002) quienes reportaron un aumento altamente significativo en la fragmentación del DNA detectado por la técnica de Tunel en blastocistos de ratón sometidos a congelamiento y descongelamiento. Para corroborar el índice de apoptosis, en el presente estudio seis embriones bovinos se analizaron con el microscopio electrónico, la cual es una técnica invasiva, pero más precisa. Con este procedimiento, se observó que el número de células apoptóticas fue similar al encontrado utilizando la técnica de Tunel, tanto en embriones frescos como congelados. Estos resultados podrían indirectamente explicar la disminución en el porcentaje de gestaciones en vacas en el trópico. A este respecto, Martínez *et al.*, 2002, Montiel *et al.*, 2002, han encontrado una reducción en los porcentajes de fertilidad en vacas cuando se transfieren embriones de alta calidad sometidos a proceso de congelación y descongelación en comparación a transferencias con embriones frescos. Igualmente, Dobrinsky (1996) presentó tasas de gestación del 28 % cuando se utilizan embriones bovinos producidos *in vitro* los cuales son congelados y descongelados previo a la transferencia.

En el presente estudio, se encontró que embriones bovinos de buena calidad los cuales fueron evaluados inmediatamente después del lavado presentaron células con características de apoptosis, estas evidencias indican que la apoptosis es un proceso fisiológico, el cual ocurre durante desarrollo embrionario. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que estos embriones son capaces de desarrollarse hasta formar blastocistos expandidos bajo condiciones de cultivo. Estos datos sugieren que el daño observado en embriones criopreservados pudiera deberse a fallas durante el almacenamiento. Basándose en los datos encontrados en el presente trabajo, es importante sugerir la realización de evaluaciones detalladas de los embriones descongelados previo al proceso de transferencia. Igualmente, es un punto importante considerar una nueva evaluación de la viabilidad del embrión previa y durante el almacenamiento.

Desde el punto de vista práctico, queda demostrado que los programas que apuntan hacia el uso de la transferencia embrionaria con el fin de mejorar la productividad en el trópico, deben contemplar la evaluación de embriones almacenados con el fin de poder obtener mejores resultados. A diferencia de los programas de inseminación artificial en donde en el semen se encuentran millones de espermatozoides, en el caso de los embriones se tiene un grupo reducido de células en donde el daño a las mismas podría comprometer la viabilidad del embrión y en consecuencia el éxito de la transferencia.

#### 4.2.5. LITERATURA CITADA

1. Aguilar M, Galina C, Merchant H, Montiel F, Canseco R, Márquez YC. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 2002, 237:1-6.
2. Baguisi A, Lonergan P, Overstrom E, Boland M. Vitrification of bovine embryos: Incidence of necrosis and apoptosis. *Therio.* 2000, 55:162.
3. Dobrinsky J. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Therio.* 1996, 45:17-26.
4. Cunningham E. The genetic improvement of cattle in developing countries. *Therio.* 1989, 31:17-28.
5. Farin P, Britt J, Shaw D, Sleining B. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Therio.* 1995, 44:339-350.
6. García E., Modificaciones al sistema de clasificación climática Koeppen. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. México, 15. 1973.
7. Green D and Reed J. Mitochondria and apoptosis. *Sc.* 1988, 281: 1309-1312.
8. Haek J, In Pyo S, Hyuck C, Do H, Young D, Churl KM. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 2002, 61:466-476.
9. Leibo S. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Therio.* 1986, 25:166.
10. Linder G, Wrigth R. Bovine embryo morphology and evaluation. *Therio.* 1983, 29:407-416.
11. Madalena F, Teodoro R, Lemos J, Montiero Y, Barbosa T. Evaluation of strategies for crossbreeding of dairy Cattle in Brazil. *J. Dairy. Sci.* 1989; 73:1887-1901.
12. Martínez A, Brogliatti G, Valcarcel A, De Las Heras M. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Therio.* 2002, 58:963-972.
13. Montiel F, Galina C, Rubio I, Corro M. Factors affecting success of embryo transfer in tropical regions. *Reprod. Dom. Anim.* (In press), 2002.

14. Overstrom E. *In vitro* assessment of embryo viability. *Therio* 1996, 45:3-16.
15. Pace M, Sullivan J. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5 ml French straws. *J. Anim. Sci.* 1981, 53:693-701.
16. Rhodes F, Galina C, Duchateau A, Soto C. An investigation into the properties of semen in the mexican tropics. *World Rev. Anim. Reprod.* 1985, 21:15-19.
17. Schneider U and Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Therio.* 1984, 21:68-79.

### 4.3. Experimento 3

## EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE EMBRIONES PRODUCIDOS POR VACAS CEBUÍNAS EN EL TRÓPICO DURANTE DOS ÉPOCAS DEL AÑO

Márquez Y.C.<sup>1</sup>, Galina C<sup>1</sup>., Moreno N<sup>2</sup>., Ruíz H<sup>3</sup>., y Merchant H<sup>2</sup>.

1. Departamento de Reproducción, FMVZ, UNAM
2. Departamento de Biología Celular y Fisiología, IIB, UNAM
3. Fideicomiso para el Mejoramiento Genético de la Ganadería del Estado de Chiapas

### RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el posible efecto de la estacional sobre la producción de embriones en vacas cebú se superovularon 40 vacas, obteniendo 158 embriones en época de lluvias y 119 en época de secas, los cuales fueron clasificados como de buena, regular y mala calidad. Los embriones fueron sujetos a evaluación ultraestructural y determinación del grado de apoptosis, mediante la técnica de Tunel. En la época de secas se colectaron 2.9 embriones/vaca, mientras que en la de lluvias se obtuvo 3.9 embriones/vaca, siendo superior la respuesta superovulatoria en la época de lluvias. Las evaluaciones ultraestructurales (n=30 secas y n=55 lluvias) no mostraron diferencias morfológicas entre embriones colectados en las diferentes épocas. El número de células Tunel-positivo fue diferente ( $p < 0.001$ ) entre embriones, siendo menor el número de células marcadas en embriones de buena calidad. Igualmente, se observó menor número de células apoptóticas en embriones de las tres calidades colectados durante la época de lluvias ( $p < 0.001$ ). Finalmente, el grupo de embriones criopreservados de buena (n=25 en cada época) y

regular calidad (n=11 secas y n=17 lluvias) mostraron que en la época de lluvias hubo una disminución ( $p<0.05$ ) del número de células Tunel-positivo. Basándose en estos resultados se puede concluir que la producción de embriones en las dos épocas evaluadas en el presente trabajo son diferentes, además de observarse que los embriones colectados en época de lluvias poseen mayor viabilidad lo cual se demuestra por el número de células con fragmentación celular.

#### 4.3.1. INTRODUCCIÓN

Gracias a los avances técnicos en los programas de transferencia embrionaria (TE), se ha logrado producir embriones en forma masiva los cuales son recuperados en etapas tempranas del desarrollo. De esa manera, las vacas de elevado valor comercial pueden producir un rango de 10 a 12 becerros por año, lo cual impulsa el mejoramiento genético de los hatos. Sin embargo, a pesar de los grandes avances logrados en la TE, los resultados obtenidos hasta el momento en condiciones del trópico no han sido del todo satisfactorios a pesar del gran interés que existe para transferir embriones de tipo F1 (cruza de Holstein con razas cebuínas) animales que han probado ser muy superiores en su producción y resistencia al medio ambiente tropical (Madalena *et al.*, 1989, Cunninham, 1989). Una de las principales razones son las constantes variaciones en la calidad de los nutrientes los cuales afectan la condición corporal de las hembras tanto receptoras del embrión como donadoras del mismo, ocasionando que la respuesta a un tratamiento hormonal pueda variar considerablemente (Montiel *et al.*, 2002, Bo *et al.*, 2002).

Los investigadores en esta área se han enfocado en los últimos años hacia la aplicación de tecnologías que ayuden a aumentar el porcentaje de gestaciones con embriones procedentes de vacas superovuladas intentando obtener la misma respuesta en las dos épocas características en las zonas tropicales, la época de secas y la correspondiente de lluvias (Randel *et al.*, 1984; Molina, 2000; Bo *et al.*, 2002). Dentro de este enfoque experimental, el estudio de las características morfológicas de los embriones ha demostrado importantes diferencias en la clasificación de los mismos de acuerdo al criterio del clínico y a estudios más exactos realizados con microscopia electrónica (Aguilar *et al.*, 2002). Estas diferencias en el criterio de evaluación de campo, el cual no es validado por un seguimiento morfológico más preciso, posiblemente contribuyan a que la fertilidad no rebase el 40% ya que es muy factible que algunos embriones sean transferidos cuando su grado de deterioro celular le impida finalizar en una gestación.

Además de la problemática observada en el momento de la recolección y evaluación, también deben considerarse los posibles cambios al congelar y



descongelar los embriones. A este respecto, Martínez et al. (2002) reportan una disminución del 10% de la fertilidad cuando se transfieren embriones criopreservados de alta calidad en comparación a embriones frescos. Estos resultados podrían ser más dramáticos en el trópico, en donde debido al bajo porcentaje de embriones que se colectan, los criterios de inclusión para transferir los embriones son menos estrictos.

En experimentos previos Molina (2000) comparó la respuesta superovulatoria y la calidad de embriones colectados en ambas épocas en vacas cebuinas, no encontrando diferencia en la respuesta superovulatoria ni en el número de embriones colectados, aunque si en la calidad de los embriones recuperados, siendo superior en la época de lluvias. Por otra parte, Massey y Oden (1984) en trabajos realizado en Texas, demostraron la existencia del efecto estacional sobre el porcentaje de embriones transferibles, al obtener en vacas Brahman un promedio de 2.6 embriones transferibles en época de invierno y 4.4 en primavera.

La cuantificación de la muerte celular por apoptosis tanto en embriones frescos como criopreservados, podría suministrar datos relevantes para lograr que los embriones transferibles efectivamente tengan capacidad de terminar en una gestación en la hembra receptora. Estos estudios básicos podrían aportar el conocimiento necesario para más adelante implementar técnicas no invasivas las cuales podrían ser aplicadas en el campo.

### **OBJETIVO GENERAL**

Realizar estudios morfológicos, además de determinar el grado de apoptosis a través de la técnica de Tunel en embriones bovinos clasificados como de buena, regular y mala calidad colectados en dos épocas contrastantes del año (la de secas y la de lluvias) con la finalidad de conocer si la producción de embriones podría realizarse durante todo el año en animales *Bos indicus*.

#### 4.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

##### ***Animales***

Se utilizaron 40 vacas Gyr, adultas en dos etapas; la primera de abril-mayo (época de secas) y la segunda en julio-agosto (época de lluvias). El estudio se realizó en el Fideicomiso para el Mejoramiento Genético de la Ganadería (FIMEGEN), localizado en Chiapas, México. El clima del estado de Chiapas se clasifica como trópico seco, con precipitaciones de 800-2,500 mm anuales. La temperatura promedio anual en el área de Tuxtla Gutiérrez donde se realizó el estudio es de 24.7° C. La temperatura promedio es de 12° C en la época de secas, mientras que en la de lluvias es de 31° C (García, 1973).

En las dos épocas se proporcionó una suplementación alimenticia durante 30 días antes de iniciar la superovulación, con un alimento concentrado que contiene 2.8 Mcal ED/kg y 14 % de PC, calculándose un consumo de 0.5 % del peso vivo/día. Tanto en la época de lluvias como en la de secas se utilizaron las mismas vacas con el fin de evitar el efecto confundido de animal.

##### ***Tratamiento Superovulatorio***

El tratamiento de superovulación consistió en la aplicación de dos implantes de un progestágeno (6 mg de Norgestomet) durante 9 días y un compuesto inyectable que contiene 5 mg de valerato de estradiol y 3 mg de Norgestomet (Syncromate B, Meriux, México). El día del retiro del implante, se aplicó una inyección de 25 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Lutalyse, Upjohn, México) para inducir la aparición del celo, 2 días después aproximadamente (celo = día 0). Las vacas que presentaron celo fueron sometidas al proceso de superovulación, a través de la aplicación de la hormona foliculo estimulante (Folltropin V-Litton, México), a una dosis de 240 mg de NIH-FSH-P1, durante los días 9, 10, 11, 12. En el día 12 se aplicaron 25 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y los días 14 y 15 se realizó la detección de celo en forma continua durante 96 horas, inseminándose artificialmente las vacas a las 12 y 24 horas después de iniciado el estro.

En ambas épocas la recolección embrionaria se realizó 7 días posteriores a la primera inseminación y los embriones obtenidos fueron evaluados inmediatamente por su observación al microscopio estereoscópico, para determinar el estado de desarrollo y calidad. Después de la recolección embrionaria, se aplicó 25 mg de prostaglandina (Lutalyse-Upjohn) repitiéndose la dosis 13 días después. La respuesta superovulatoria se evaluó de acuerdo a lo descrito por Bastidas y Randel, (1987) clasificándose sobre la base de la cantidad de embriones colectados, siendo buena la respuesta cuando se obtienen > 3 embriones y pobre < 3 embriones transferibles por vaca.

### ***Evaluación Morfológica de los Embriones***

Los embriones fueron evaluados por un técnico calificado y clasificados de acuerdo a los criterios descritos por Linder y Wright (1983), en

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

Una vez realizada la evaluación estereoscópica, 30 embriones colectados en secas y 55 obtenidos en la época de lluvias, se sometieron al análisis por microscopía de luz y electrónica. Para tal efecto, se fijaron en Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965) durante 30 minutos, luego se colocaron en buffer de Cacodilato de sodio pH 7.4. Una vez en el laboratorio, se realizó una post-fijación en solución de Tetróxido de Osmio al 1% para posteriormente deshidratarlos en alcoholes a concentraciones crecientes (70, 80, 90, 100%) e incluirlos en EPON 812 y proceder a realizar los cortes seriados de 1 micra, los cuales se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% y se analizaron al microscopio de luz. Estas evaluaciones se hacen con la finalidad de observar el nivel en el cual se deben realizar los cortes finos y evaluar nuevamente los embriones basándose en los criterios descritos anteriormente.

Sobre la base de estas observaciones, se obtuvieron los cortes finos para realizar estudios de ultraestructura en el microscopio electrónico Zeiss 9A, de acuerdo a los criterios descritos por Aguilar et al., 2002.

### ***Congelamiento y Descongelamiento de Embriones:***

Un total de 50 embriones clasificados como de buena calidad (25 de secas y 25 de lluvias) y 28 de regular calidad (11 de secas y 17 de lluvias), fueron congelados en pajillas con 1.4 M de glicerol (Sigma, St. Louis, Mo, USA), en buffer de fosfato Dulbecco (PBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) usando el procedimiento de 2 pasos de congelación. Primer paso: Inducción de la cristalización reduciendo la temperatura 1°C/min hasta -7°C. Segundo paso: Transferencia a nitrógeno líquido con una reducción de 0.3°C/min hasta -35°C (Leibo, 1986). Para descongelar los embriones, se colocaron las pajillas en agua a 37°C, removiendo el glicerol y fueron equilibrados los embriones en glucosa 0.5 M y posteriormente colocados en medio de transferencia el cual contenía PBS y suero fetal bovino.

### ***Determinación del Grado de Apoptosis: Técnica de Tunel***

Una vez descongelados los embriones del grupo de criopreservación como se indicó anteriormente y de obtenido los procesados en fresco, se determinó el grado de fragmentación del ADN (apoptosis) por la técnica de Tunel utilizando el kit de Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA). Los embriones fueron fijados en Paraformaldehído al 4% (Aldrich Chemicals Company Inc., USA) en PBS, pH 7.4 por 30 minutos a temperatura ambiente y luego transportados en PBS bajo refrigeración. Una vez en el laboratorio fueron permeabilizados con Triton X-100 al 0,1% (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), lavados en PBS e incubados a 37° C por 1 hora con 50 µl de solución de Tunel (fluresceína-dUTP acoplada a la enzima deoxynucleotidil transferasa tdt). De esta manera, es posible detectar la fragmentación de las cadenas de DNA marcando el extremo 3'-OH libres que ocurre durante la muerte celular con un nucleotido marcado (fluresceína-dUTP) por medio de la enzima tdt. El ADN marcado es detectado con un microscopio confocal LSM 5 Pascal, Zeiss. (Argon-Krypton laser), con filtro BP 450-490. Los controles positivos fueron incubados durante 10 minutos con la enzima Dnasa (Gibco BRL, Grand Island,

NY, USA) y posteriormente tratados con solución Tunel. En el caso del control negativo sólo fue tratado con fluoresceína-dUTP sin la presencia de la enzima.

### ***Análisis de los Resultados***

El análisis de las características morfológicas de los embriones de buena, regular y mala calidad así como la evaluación de la respuesta superovulatoria, tanto en época de seca como en lluvias se realizó a través de estadística descriptiva. Para comparar en grado de apoptosis en embriones de las 3 categorías, procesados posterior al lavado, se utilizó análisis factorial, siendo la variable dependiente el número de células apoptóticas e independientes la calidad embrionaria y la época de año. Finalmente para comprobar el efecto estacional sobre el índice de apoptosis en embriones criopreservados, los cuales fueron clasificados como de buena y regular calidad, se utilizó Análisis de varianza, seguido por comparación de medias a través de la prueba de Duncan. En todos los casos se consideró un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS (Statistica Package for Social Science) versión 10.0.

### 4.3.3. RESULTADOS

#### ***RESPUESTA SUPEROVULATORIA***

La respuesta superovulatoria se evaluó basándose en el número de embriones colectados en cada una de las épocas. En la época de lluvias se colectó un total de 141 embriones, mientras que durante la época de secas se colectaron 108 embriones. Al determinar el promedio de embriones producidos por vaca, se obtuvo 3.5 embriones/vaca en la época de lluvias mientras que en secas se colectó un promedio de 2.7 embriones/vaca.

#### ***EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES DE BUENA, REGULAR Y MALA CALIDAD COLECTADOS EN ÉPOCA DE SECAS Y LLUVIAS***

Se evaluaron 30 embriones durante la época de secas, de los cuales 10 fueron clasificados como de buena calidad, 9 de regular y 11 de mala calidad. Durante la época de lluvias, se analizaron 55 embriones, clasificados 21 como de buena, 14 como de regular y 20 como de mala calidad.

En cuanto a los resultados obtenidos, en primer lugar se determinó que las características ultraestructurales que determinan la calidad embrionaria varían entre embriones de buena regular y mala calidad. Al comparar las características morfológicas entre los embriones colectados en secas y lluvias, no se observó diferencias, es decir que las características ultraestructurales de un embrión bueno, regular o malo siguen siendo las mismas en cualquier época del año.

En cuanto a las características morfológicas, los embriones de buena calidad presentan blastómeros bien delimitados, núcleos con cromatina densa y bien localizada. Dentro de los blastómeros existieron vesículas lipídicas de forma circular, no muy abundantes, pocos lisosomas. Las mitocondrias de forma circular y/o alargadas, observándose cristales mitocondriales de diversas formas y longitudes, estas se ubican cerca del núcleo, estrechamente asociados a las mitocondrias pudo visualizarse un puntillado obscuro que son los ribosomas y poliribosomas. Entre los blastómeros destacan las uniones celulares que por lo general se forman por desmosomas, observándose como dos placas electrodensas constituidas por filamentos. En la cara externa de la

membrana citoplasmática se encuentran abundantes microvellosidades que se dirigen hacia el espacio perivitelino, estos se observan como filamentos largos, delgados y abundantes(fig. 1-3).

En general, en los embriones que se clasificaron como de regular calidad se observan algunos blastómeros en etapa de degeneración los cuales son fagocitados por blastómeros en buen estado, sin embargo, la mayoría de los blastómeros poseen forma redondeada, núcleos en buenas condiciones, cohesión entre las células. Igualmente, destacan abundantes lisosomas y grandes inclusiones lipídicas aunque en menor cuantía que los del grupo de embriones de mala calidad. A la par se observan, blastómeros bien delimitados, los núcleos con cromatina densa bien localizada, abundantes mitocondrias de diferentes formas y tamaños, disminución en la cantidad y el tamaño de las microvellosidades, lo que se traduce en una mala absorción y por lo tanto en problemas para el transporte de nutrientes (fig. 2-3).

Entre las características ultraestructurales de los embriones que fueron clasificados como de mala calidad, destacan la presencia de algunos blastómeros muertos o degenerados, abundantes fagosomas. Igualmente, se observan blastómeros los cuales poseen núcleos que aun se encuentran en buenas condiciones, a pesar de presentar gran cantidad de lisosomas y de vesículas lipídicas, mitocondrias alargadas y/o redondeadas con pocos cristales mitocondriales, ausencia de microvellosidades hacia cara externa. En el espacio perivitelino se presentan abundantes detritus celulares (fig. 3-3).

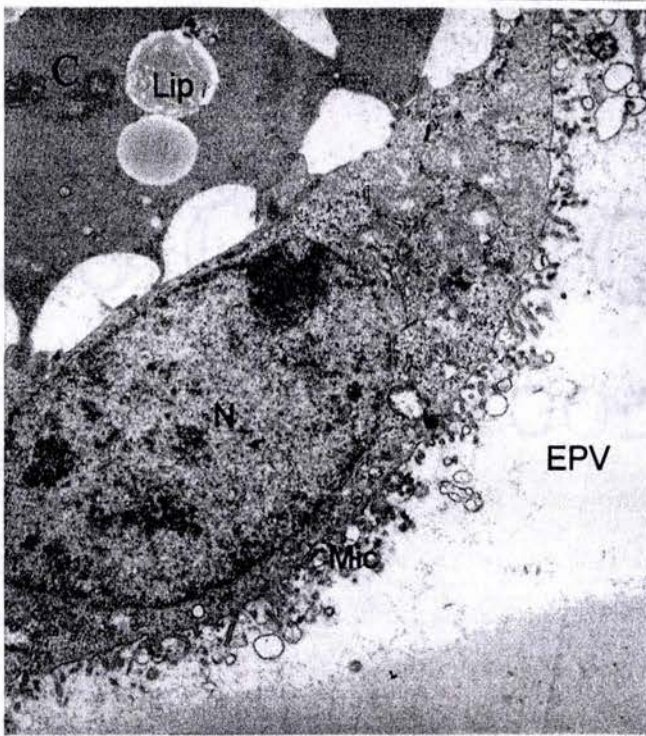
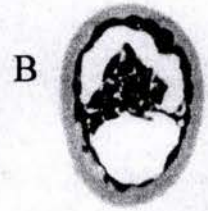
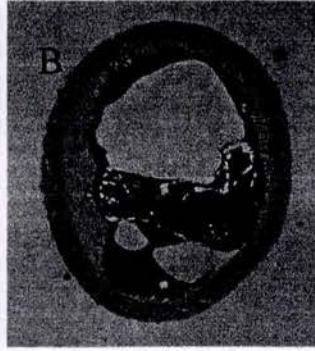
#### ***GRADO DE APOPTOSIS EN EMBRIONES FRESCOS COLECTADOS DURANTE LA ÉPOCA DE SECA Y LLUVIAS.***

Se evaluaron 61 embriones colectados durante la época de lluvias de los cuales 21 fueron clasificados como de buena calidad, 20 como de regular y 20 de mala calidad. Durante la época de secas, se analizaron 53 embriones de los cuales 16 fueron de buena, 20 de regular y 17 de mala calidad. En ambos casos se seleccionaron blastocistos maduros e iniciales para el grupo de

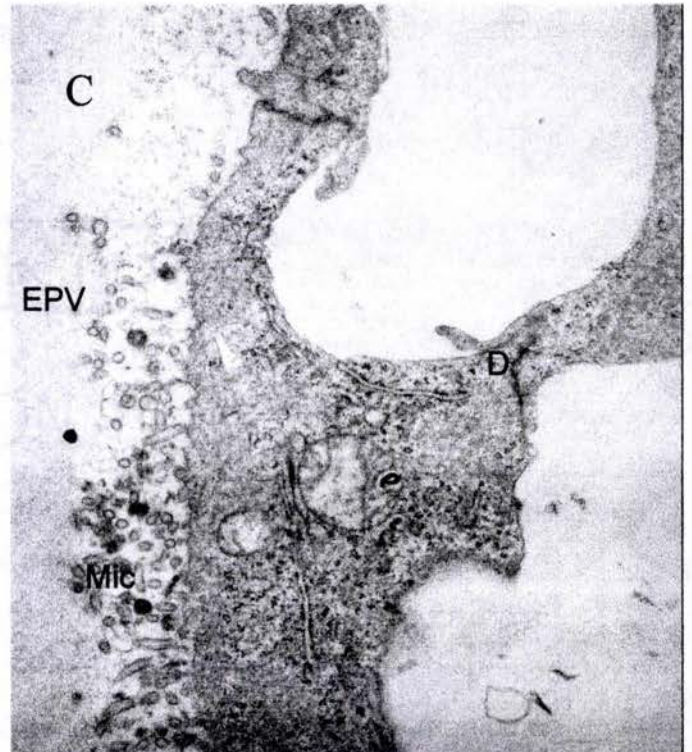
**Fig 1-3.** Embriones bovinos de buena calidad colectados en secas y lluvias. (A) Se muestran embriones de buena calidad observado al Microscopio Esterescópico en el cual los blastómeros están bien delimitados. (B) El mismo embrión observado al Microscopio de luz (cortes semifinos), (C) al Microscopio electrónico se evidencian blastómeros bien delimitados, núcleos (N) con su heterocromatina, algunas vesículas lipídicas (Lip) y gran cantidad de microvellosidades (Mic) 2.500X.



## EMBRIÓN BUENA CALIDAD

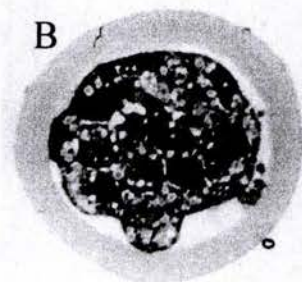
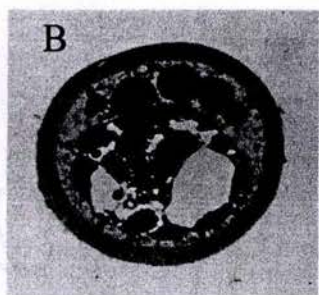
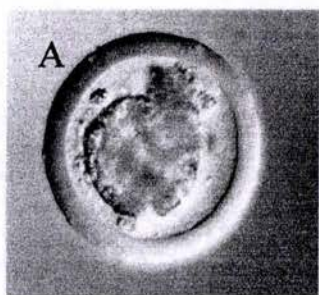


Época de lluvias

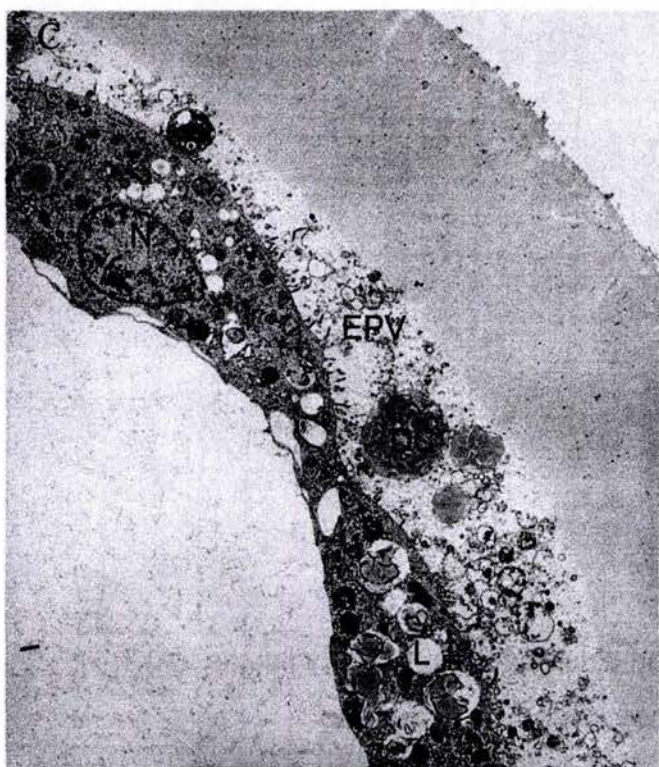


Época de secas

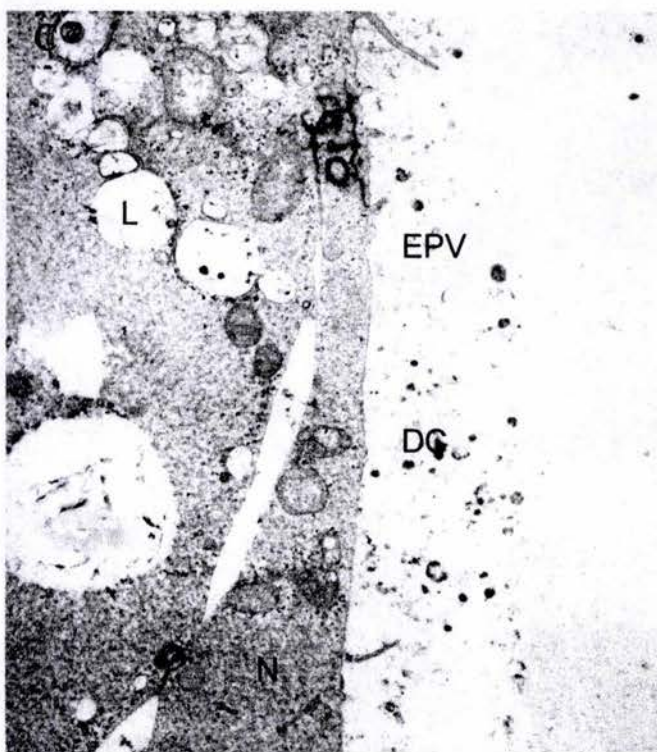
# EMBRIÓN REGULAR CALIDAD



CONTIENE ALGODON



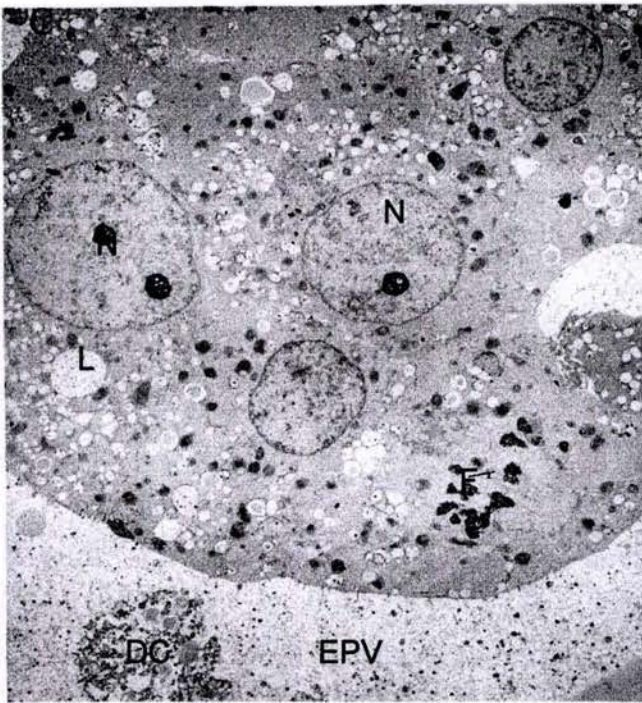
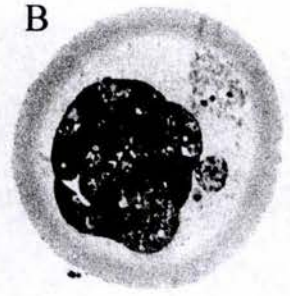
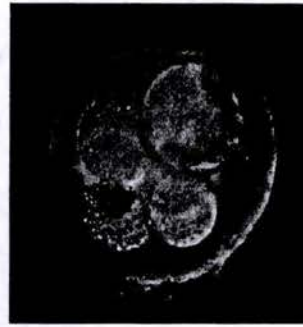
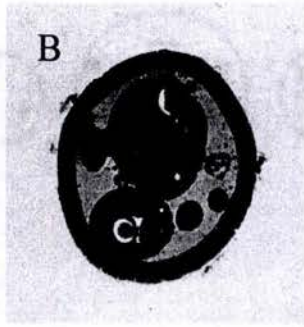
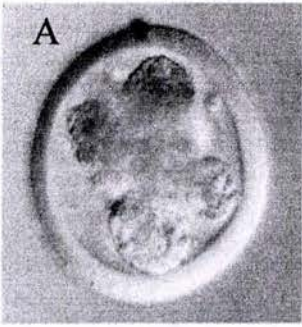
Época lluvias



Época secas

**Fig 2-3.** Embriones bovinos de mala calidad colectados en secas y lluvias. (A) Se muestran embriones de mala calidad observado al Microscopio Esterescópico en el cual se evidencia n blastomeros muy separados y de diferentes tamaños. (B) El mismo embrión observado al Microscopio de luz (cortes semifinos), (C) al Microscopio electrónico se observan blastomeros poco delimitados , núcleos (N) con su heterocromatina, gran cantidad de lisosomas (L) y detritus celulares en el espacio perivitelino (DC), ausencia de microvellosidades (Mic), lípidos en el citoplasma y fagosomas (F) 2500X.

# EMBRIÓN MALA CALIDAD:



Época de lluvias



Época de secas

**Fig 2-3.** Embriones bovinos de mala calidad colectados en secas y lluvias. (A) Se muestran embriones de mala calidad observado al Microscopio Esterescópico en el cual se evidencia n blastomeros muy separados y de diferentes tamaños. (B) El mismo embrión observado al Microscopio de luz (cortes semifinos), (C) al Microscopio electrónico se observan blastomeros poco delimitados , núcleos (N) con su heterocromatina, gran cantidad de lisosomas (L) y detritus celulares en el espacio perivitelino (DC), ausencia de microvellosidades (Mic), lípidos en el citoplasma y fagosomas (F) 2500X.

embriones de buena calidad, mórulas y blastocistos iniciales en el grupo de regular y para el grupo de mala calidad embriones de 8 a 16 células.

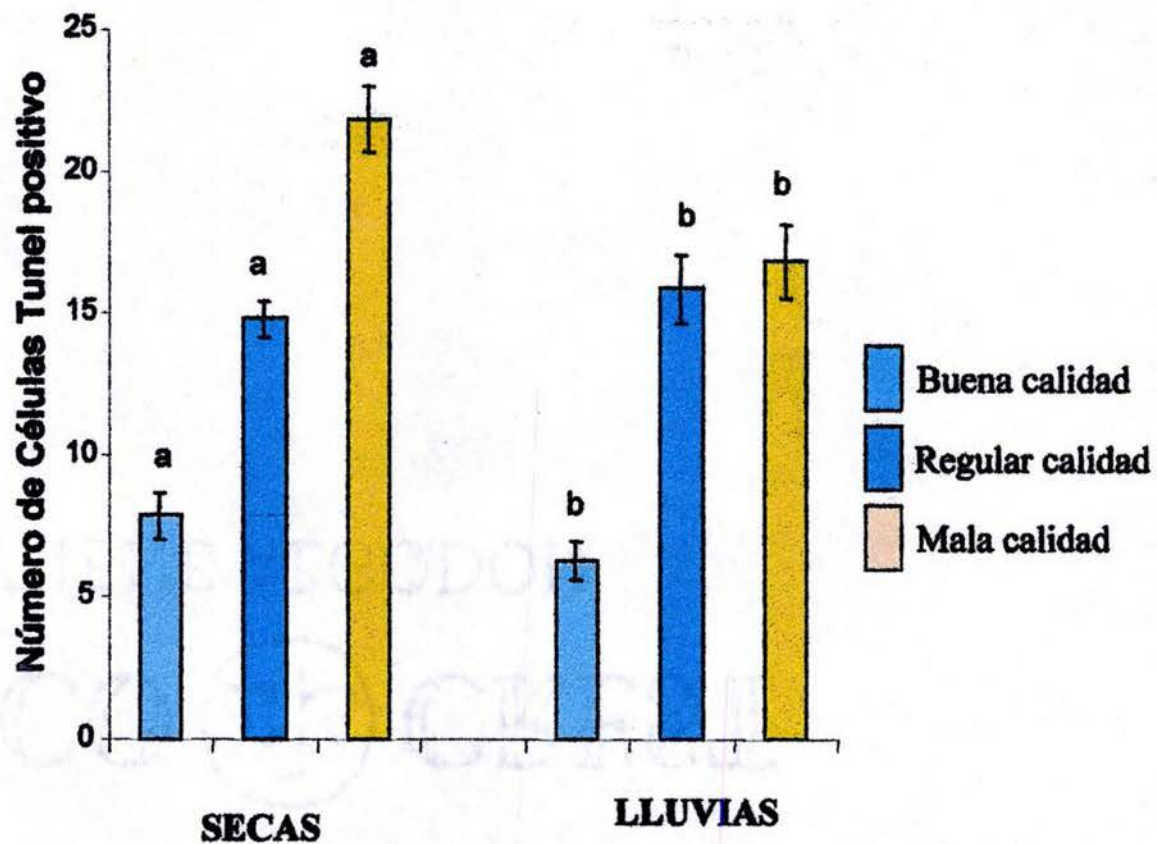
Los embriones clasificados como de buena calidad, colectados durante la época de seca presentaron  $7.8 \pm 0.8$  células Tunel-positivo, mientras que los colectados en lluvias los valores fueron de  $6.2 \pm 0.6$ . ( $P < 0.001$ ) En el caso de los embriones de calidad regular fueron de  $14.80 \pm 0.63$  células apoptóticas para los colectados en seca y  $15.8 \pm 1.2$  para los de lluvias. ( $P < 0.05$ ) Los embriones de mala calidad presentaron el mayor número de células marcadas, siendo  $21.8 \pm 1.1$  y  $16.8 \pm 1.3$  ( $P < 0.01$ ) para los colectados durante la época de seca y lluvias, respectivamente (fig. 4-3 y 4-6).

En ambas épocas, los embriones incubados con DNasa mostraron una distribución uniforme de núcleos Tunel-positivos en todas las células, demostrando de esta manera que este método muestra buena confiabilidad para detectar fragmentación celular (controles positivos). En contraste, ninguno de los núcleos fue marcado en embriones incubados sin la enzima dinucleotidil transferasa terminal (Control negativo).

#### ***GRADO DE APOPTOSIS EN EMBRIONES CRIOPRESERVADOS DURANTE LA ÉPOCA DE SECA Y LLUVIAS.***

Con la finalidad de corroborar el efecto estacional en embriones susceptibles a ser criopreservados, se evaluaron 50 embriones bovinos de buena calidad, 25 colectados y congelados en cada una de las épocas. Igualmente se analizaron 28 embriones de regular calidad, 17 pertenecientes a la época de secas y 11 a la de lluvias.

Los embriones de buena calidad colectados y criopreservados durante la época de lluvias ( $15.3 \pm 0.3$ ) presentaron menor número de células Tunel positivo que los embriones de época de seca ( $19.7 \pm 0.8$ ). Igualmente, los embriones de regular calidad colectados en lluvias ( $17.5 \pm 0.2$ ) presentaron una disminución del número de núcleos marcados que embriones de regular



**Fig.. 4-3. GRADO DE APOPTOSIS EN EMBRIONES BOVINOS COLECTADOS EN DOS ÉPOCAS DEL AÑO**

Los valores representan  $X \pm ES$   
 ab  $p < 0.001$

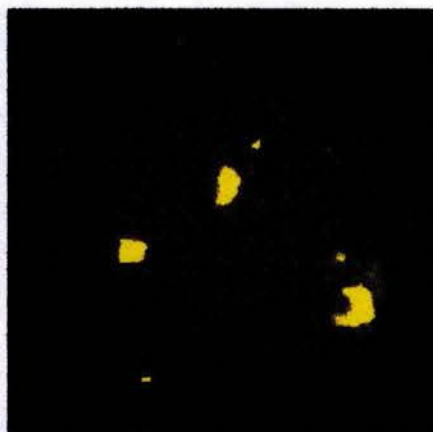
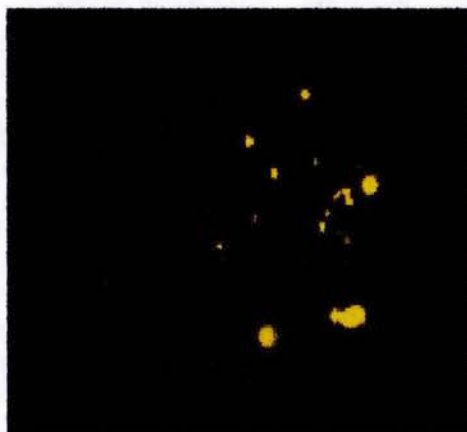
**Fig. 6-3.** Embriones bovinos procesados luego de ser colectados en diferentes épocas en los cuales se muestran el número de células Tunel Positivo.. El número de células Tunel positivo fue diferente en embriones colectados en época de secas al compararlos con los colectados en lluvias 2500X.



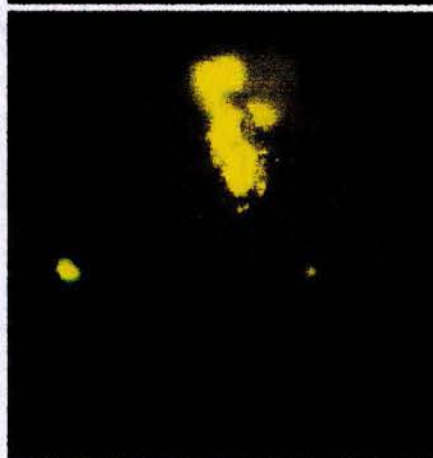
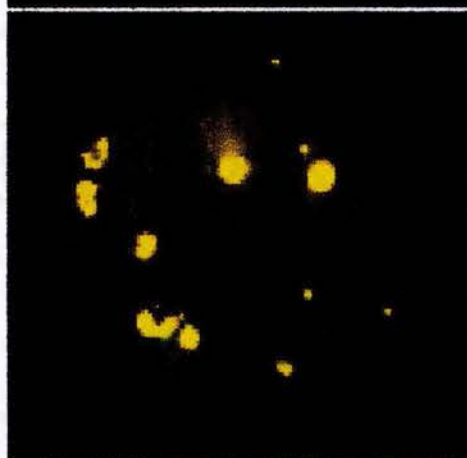
**SECAS**

**LLUVIAS**

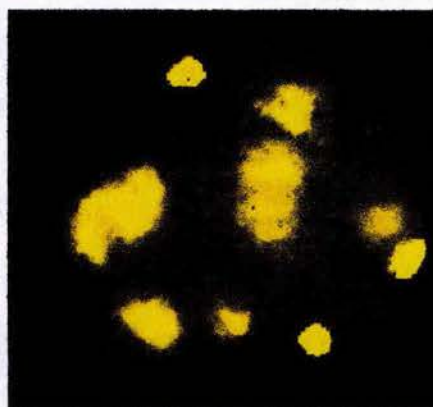
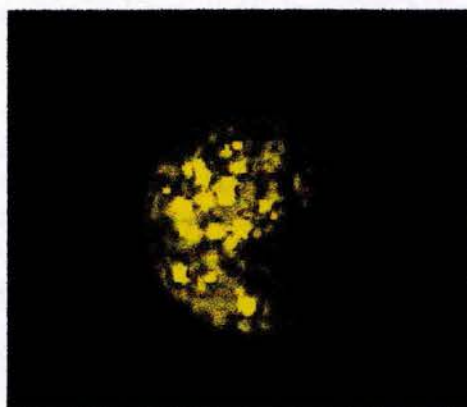
**Buena calidad**



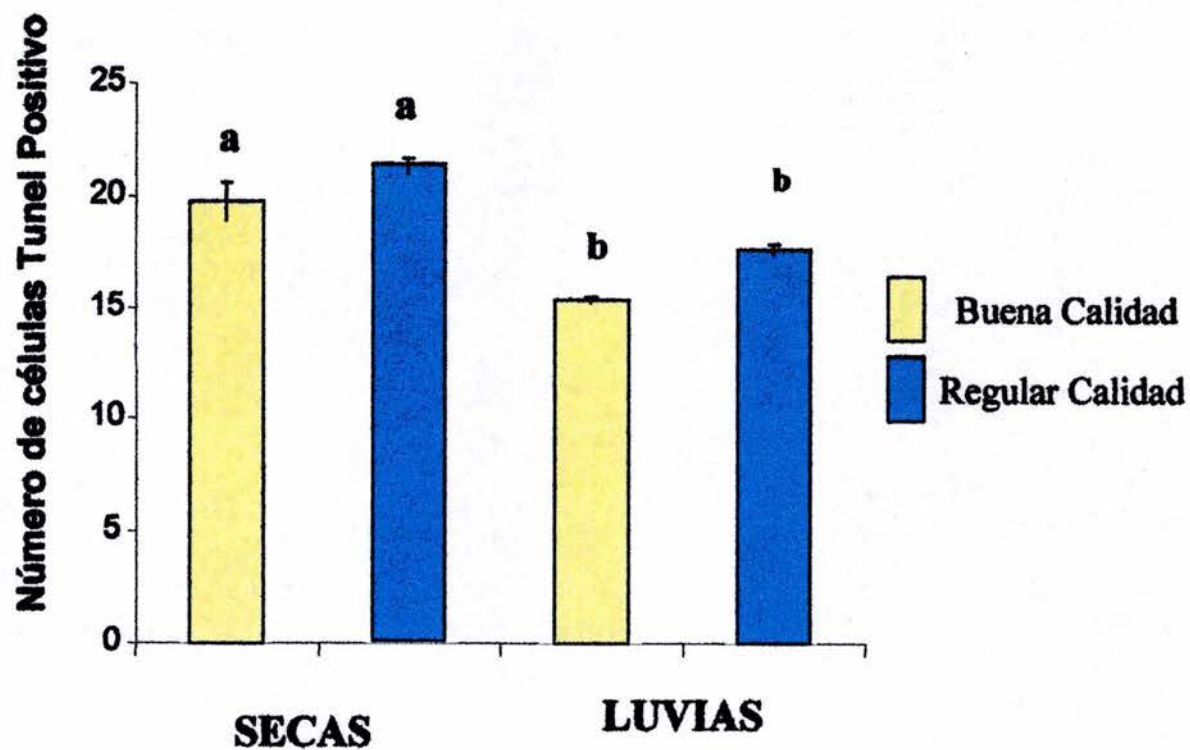
**Regular calidad**



**Mala calidad**



calidad, pero criopreservados en secas ( $21.2 \pm 0.3$ ). Las diferencias son diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de secas y lluvias (fig. 5-3).



**Fig. 5-3. GRADO DE APOPTOSIS EN EMBRIONES BOVINOS CONGELADOS EN DOS EPOCAS DEL AÑO**

Los valores representan  $X \pm ES$   
 ab  $p < 0.05$

#### 4.3.4. DISCUSIÓN

A pesar de que el ganado bovino no es una especie estrictamente estacional, su función reproductiva se ve influenciada por la época del año. Esta estacionalidad sobre el proceso reproductivo en el ganado *Bos Indicus* ha sido estudiada por muchos autores en diferentes localizaciones geográficas, en donde se ha estudiado entre otros parámetros la duración del estro (Randel, 1984), los niveles séricos de progesterona (Rubio *et al.*, 1989) y el porcentaje de fertilidad (Masey y Oden, 1984).

En la presente investigación, se encontró que existe una mejor respuesta superovulatoria sobre la base del número de embriones colectados en la época de lluvias (3.9 embriones/vaca) cuando se compara con la de secas (2.9 embriones/vaca). Estos resultados se asemejan a los reportados por Massey y Oden (1984) quienes observan en vacas Brahman un promedio de 2.6 embriones transferibles en época de invierno y 4.4 en primavera. Igualmente, Bastidas y Randel (1987) colectaron un máximo de 4.2 embriones por lavado durante el otoño y un mínimo de 2.9 durante el invierno en 813 donadoras Brahman. Sin embargo, Shea (1981), no encontraron diferencias significativas en la cantidad de embriones transferibles por año ni por mes. Por su parte, Molina (2000), Páez (2001), encontraron que el patrón de crecimiento folicular y el número total de ovulaciones no varían con la estación, pero si hubo diferencias estacionales en el número de embriones transferibles. Basándose en los resultados del presente estudio se puede inferir que en condiciones de trópico mexicano existe un efecto estacional en vacas cebuínas lo que se evidencia por el número de embriones colectados en las diferentes épocas del año. Sin embargo, es importante considerar que durante la época de secas la cual es menos favorable, al aplicar un tratamiento superovulatorio, la población folicular presente en los ovarios no es la mejor, de modo que al inducir una respuesta superovulatoria a través del uso de hormonas exógenas se está obligando a estos folículos a crecer para que puedan ser fertilizados, pero su desarrollo y crecimiento tras la fertilización no es la adecuada.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de realizar evaluaciones ultraestructurales de embriones bovinos, con la finalidad de determinar si

existen diferencias morfológicas en embriones colectados en las dos épocas del año descritas anteriormente. Nuestros resultados demuestran que no existen diferencias es decir que los embriones de buena, regular y mala calidad colectados en secas poseen las mismas características ultraestructurales que los colectados durante la época de lluvias. A este respecto, Aguilar et al. (2002) en un estudio realizado en el trópico mexicano, evaluaron embriones bovinos F1 de buena, regular y mala calidad, encontrando que las características morfológicas difieren considerablemente entre los embriones de las tres categorías, sin embargo en este trabajo no se consideró la época del año.

No existen trabajos anteriores en donde se relacione el número de células apoptóticas con la estación del año en embriones bovinos. Los resultados del presente trabajo, mostraron células con núcleos marcados en todos los grupos de embriones, obteniéndose así un 100% de embriones con al menos una células con fragmentación. De la misma manera se encontró, que existe una diferencia ( $p < 0.001$ ) entre embriones de buena regular y mala calidad, siendo menor el número de células Tunel positiva en los primeros. Estos resultados podrían indicar que el índice de apoptosis esta relacionado con la calidad del embrión y que el proceso de muerte celular programada forma parte integral del desarrollo embrionario, sin embargo cuando el porcentaje de células con estas características aumenta significativamente compromete la viabilidad del embrión. Posiblemente la muerte celular en el blastocistos es un mecanismo por medio del cual los embriones pueden eliminar células en la masa interna que aun poseen el potencial para formar trofoectodermo, reduciendo el riesgo de diferenciación ectópica durante la diferenciación de las capas germinales. Igualmente puede ocurrir con el fin de eliminar células anormales o con potencial inadecuado de desarrollo (Matwee *et al.*, 2000). Similar a nuestros resultados, Van Soom et al. (2000) reportaron que el 66% de mórulas y el 94% de blástocistos clasificadas como excelentes presentaron al menos una célula Tunel positiva.

En el presente estudio fue posible mostrar un efecto estadísticamente significativo al relacionar la calidad de los embriones con la época del año, en donde se observa que los embriones colectados durante la época de lluvias

poseen menor número de células Tunel-positivas que los de la época de secas. Todo lo anterior podría indicar una mayor viabilidad en embriones producidos cuando las condiciones del medio ambiente son favorables. Estos resultados apoyan a los reportados por Al-Katanani *et al.*, (2002) quienes en un estudio realizado en Louisiana y Wisconsin muestran que la proporción de ovocitos que se desarrollan a blastocisto fue menor en los meses de verano cuando se compara con otros meses del año. Contrariamente, Rivera *et al.* (2001) no encontraron este efecto estacional sobre el desarrollo de los blastocistos. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el presente trabajo fue realizado bajo condiciones de trópico, en donde posiblemente las condiciones adversas sean más acentuadas.

En cuanto al grado de apoptosis en embriones bovinos criopreservados durante lluvias y secas, se confirmó que los embriones de buena y regular calidad colectados y congelados durante la primera época poseen una disminución ( $p < 0.05$ ) en el número de células Tunel positivo que los embriones del mismo grupo, pero colectados y congelados en secas. A diferencia de estos resultados, en la presente investigación se encontró que los embriones de buena calidad criopreservados en época de secas no presentan diferencias estadísticas cuando se comparan con los de regular calidad, colectados y congelados en lluvias, es decir que los embriones de regular calidad pertenecientes a la estación de lluvias poseen igual posibilidad de desarrollarse que los embriones de buena calidad de la época de secas. Al comparar embriones de buena y regular calidad colectados ambos en época de secas, no se encontraron diferencias estadísticas. Estos resultados confirman la existencia de un efecto estacional sobre la producción de embriones *Bos Indicus*, siendo definitivamente superiores los embriones colectados durante la época de lluvias.

Sobre la base de estos antecedentes, es importante recomendar que los programas de transferencia de embriones que se realicen en el trópico, se aboquen a concentrar los trabajos inherentes a la colección y congelamiento de embriones en la mejor época del año (lluvias), lo que podría resultar en mejores índices de gestación una vez que los embriones sean transferido

#### 4.3.5. LITERATURA CITADA

1. Aguilar M, Galina C, Merchant H, Montiel F, Canseco R, Márquez YC. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 2002, 37:1-6
2. Al-Katanani Y, Rivera R, Hansen P. Seasonal variation in development of *in vitro* produced bovine embryos. *Vet. Rec.* 2002, 150:486-487.
3. Bastidas P. and Randel R. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Therio*, 1987, 28(4): 531541.
4. Betts D. and King W. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Therio*. 2001, 55:171-191.
5. Bo G, Baruselli P, Moreno D, Cutaia I, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft R. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Therio*. 2002, 51:53-72.
6. Chartrain I. and Picard L. Ultrastructural Analysis of bovine embryos at days 6 to 8: Correlation with embryo quality. *Therio*. 1988; 29:236.
7. Cunningham E. The genetic improvement of cattle in developing countries. *Therio*. 1989, 31:17-28.
8. Fléchon J and Renard J. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. and Fert.*. 1978; 53: 9-12
9. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática Koeppen. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. México, 15-19. 1973.
10. Haek J, In Pyo S, Hyuck C, Do H, Young D, Churl K. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. *Mol. Reprod. and Develop.* 2002. 61:466-476.
11. Hyttel P, Lehn-jensen T, Greve T. Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by a two-step freezing method. *Acta anatomic.* 1986, 125:27-31
12. Karnovsky M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1965, 27:137.
13. King W, Shepherd D, Plante L, Powell R, Looney C, Barnes F. An ultrastructural study of bovine embryos produced by nuclear transfer. *Therio*. 1992; 37:238.

14. Leibo S. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Therio*. 1986, 25:166.
15. Linder G, Wright R. Bovine embryo morphology and evaluation. *Therio*. 1983, 29:407-416.
16. Madalena F, Teodoro R, Lemos J, Montiero Y, Barbosa T. Evaluation of strategies for crossbreeding of dairy Cattle in Brazil. *J. Dairy. Sci.* 1989; 73:1887-1901.
17. Martínez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, De Las Heras MA. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Therio*. 2002, 58: 963-972.
18. Massey J. and Oden A. No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Therio*, 1984, 21:197-211.
19. Matwee C, Betts D, King W.. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*. 2000, 8:57-68.
20. Merchant H, Chang M. An electron Microscopic Study of mouse eggs matured *in vivo* and *in vitro*. *Anatom. Record*. 1971; 171:31-38.
21. Molina J. Efecto de la adición de somatotropina bovina al tratamiento de Follitropin-V sobre la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en vacas cebuínas superovuladas en dos épocas del año en el trópico húmedo mexicano (Tesis de Maestría). México, D.F México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2000.
22. Montiel F, Galina C, Rubio, M. Factors affecting success of embryo transfer in tropical regions. *Reprod. Dom. Anim.* (enviado), 2002.
23. Mohr L and Trounson A. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 1981; 25: 1009-1025.
24. Páez G. Factibilidad de producir embriones con vaquillas Brahman (*Bos indicus*) en condiciones trópicas (Tesis de Maestría). México, D.F México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.
25. Pullan N. Condition scoring in Fulani cattle. *Tropic. Anim. Health* 1978, 10. 118-120.
26. Randel R. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Therio*. 1984;21:170-185.



27. Rivera R. and Hansen P. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reprod.* 2001, 121:107-115.
28. Rubio I, Moreno IY, Galina CS, Escobar FJ, Ramírez B, Navarro-Fierro R. Progesterona sérica, expresión de estro y fertilidad después de la inyección de prostaglandina F2 alfa en ganado cebú en verano e invierno. *Veterinaria México* 1989; 20: 145-149
29. Shea B. Evaluating the bovine embryo. *Therio.* 1981; 15: 31-35
30. Van Soom A, Vanroose G, Laevens H, Kruif A. Apoptosis *in vitro*-produced bovine embryos. *Therio.* 2000, 53:366-367.

## VI. DISCUSIÓN GENERAL

Gracias a los avances técnicos en los programas de TE, en la actualidad se ha logrado una producción masiva de embriones que se recuperan en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento en condiciones del trópico no han sido del todo satisfactorios a pesar del gran interés que existe en transferir embriones de tipo F1 (cruza de Holstein con razas cebuínas), animales que han probado ser muy superiores en su producción y resistencia al clima cálido (Cunningham, 1989). A este respecto Massey y Oden (1984) encontraron que las vacas de razas Europeas producen mayor número de embriones transferibles por vaca y mayor tasa de fertilización que vacas Brahman bajo condiciones tropicales. Por lo que las investigaciones en este campo deben enfocarse hacia la aplicación de tecnologías que ayuden a aumentar el porcentaje de gestaciones con embriones procedentes de vacas superovuladas. Dentro de estas técnicas, la correcta evaluación de los métodos de clasificación con el fin de dictaminar que tan efectivo es el pronóstico que emite un clínico de campo sobre la viabilidad de un embrión. El estudio de las características morfológicas de los embriones con el propósito de aplicar criterios menos subjetivos para dictaminar si un embrión transferido es capaz de producir una gestación y la evaluación de la calidad de los embriones producidos en dos épocas contrastantes del año con el propósito de determinar si es posible producir embriones de la misma calidad. Son algunas de las preguntas que se han contemplado en la presente disertación.

Indiscutiblemente uno de los aspectos de mayor importancia para el éxito de la TE, es la evaluación del estado de desarrollo embrionario, así como su calidad (Linder y Wrigth, 1983), y esto se realiza generalmente mediante la observación estereoscópica que no siempre ha probado ser un método efectivo en la predicción de la fertilidad a obtener con los diferentes grupos de embriones (Rondeau *et al.*, 1995). A este respecto en la presente investigación se encontró que la evaluación de los embriones por medio de la técnica de microscopia estereoscópica fue muy subjetiva, ya que, muchos embriones que se clasificaron por esta técnica como de buena calidad al ser evaluados por

microscopia de luz y electrónica presentan características de embriones en estado de degeneración. Esta situación se agrava en condiciones tropicales en donde debido al bajo número de embriones que se colectan los criterios de inclusión son menos estrictos afectando los resultados en los programas de transferencia.

Estas evidencias podrían explicar los bajos porcentajes de gestación cuando se transfieren embriones criopreservados, los cuales no rebasa el 30% en condiciones de trópico (Galina y Arhtur, 1990), ya que en muchas ocasiones se pudieran estar congelando embriones los cuales presentan problemas desde el momento de la selección y estas alteraciones se pudieran estar acentuando durante el proceso de congelar y descongelar los embriones. Obviamente, es necesario realizar más investigaciones en esta área para discernir si la técnica de clasificación es la adecuada o si el grupo de animales *Bos Indicus* evaluado en este estudio proporciona embriones viables los cuales coincidan con los criterios de selección actualmente en uso. Igualmente hay que plantear la necesidad de encontrar técnicas alternas y no invasivas como la utilización de colorantes vitales no dañinos a la células que pudieran representar una alternativa para la evaluación de la viabilidad embrionaria previa a la transferencia. Estas herramientas podrían mejorar los programas y de esta manera difundir a un menor costo esta técnica reproductiva que indudablemente facilita la difusión de genes y fenotipos en diversos medios.

Otra causa potencial de error en la técnica de TE, es el hecho de que los embriones son clasificados por examen estereoscopio de rutina antes de ser congelados y la calidad del embrión no se vuelve a evaluar durante el almacenamiento, a diferencia de otras células criopreservadas como son los espermatozoides donde los filtros para medir la resistencia de las células a la congelación empiezan desde el inicio del proceso y se mantienen durante el almacenamiento. En la presente investigación se demostró que embriones almacenados por mas de 10 años tuvieron un aumento ( $p < 0.001$ ) en el número de células apoptóticas al compararlo con embriones almacenados por un periodo de tres años. Este hallazgo tiene implicaciones practicas importantes en el trópico, ya que, es muy probable que se estén transfiriendo embriones

con pocas posibilidades de finalizar en una gestación. Igualmente, es importante pensar que la manipulación y cuidados de los embriones almacenados es un punto crítico para la viabilidad de las células embrionarias. A este respecto es importante resaltar que evaluaciones realizadas en algunos embriones colectados por LICONSA (Leche industrializada Conasupo S.A.), los cuales fueron distribuidos a diferentes estados de la República Mexicana como parte de un programa de mejoramiento genético presentaban un alto grado de degeneración. Este hecho pudiera deberse a que durante la distribución, factores externos como disminución del contenido de nitrógeno líquido a niveles por debajo de lo permisible, manipulación excesiva de las canastillas donde se encontraban los embriones para fines de inventario, transporte, obtención de embriones para transferirlos. Todo esto afecta los embriones almacenados al someterlos a cambios bruscos de temperatura, pudiendo producir pérdidas al causar daños irreversibles en las células embrionarias los cuales no se notarán hasta que les toque su turno para ser descongelados. Basándose en estos hallazgos, es importante sugerir la realización de evaluaciones detalladas de los embriones descongelados previo al proceso de transferencia. Igualmente se debe considerar evaluaciones periódicas de la viabilidad de los embriones almacenados con el fin de evitar errores de mayor magnitud en el futuro.

A pesar de que el ganado bovino no es una especie estrictamente estacional, su función reproductiva se ve influenciada por la época del año. En base a esta premisa, en los últimos años las investigaciones se han centrado hacia la aplicación de tecnologías que ayuden a aumentar el porcentaje de gestaciones con embriones procedentes de vacas superovuladas intentando obtener una respuesta similar en las dos épocas características en las zonas tropicales, la época de secas y la correspondiente de lluvias (Randel *et al.*, 1984; Molina, 2000; Bo *et al.*, 2002). Dentro de este acercamiento experimental, el presente trabajo pretendió evaluar a través de la manipulación hormonal exógena de los mismos animales en las dos épocas, la calidad de los embriones producidos. La hipótesis planteada se basa en la suposición de que la población folicular (folículos emergentes con posibilidades de ser reclutados por ser FSH dependientes) es diferente en las dos épocas. Anteriormente,

otros investigadores han intentado determinar el efecto de la época del año sobre la cantidad de embriones producidos midiendo la respuesta en base al total de embriones colectados (Molina 2000, Paz, 2001) prestando poca atención a la calidad de los mismos los cuales intentamos caracterizar por medio de la supervivencia de la célula después de ser expuesta a un proceso de criopreservación, esperando que embriones con características morfológicas adecuadas por medio de la microscopia de luz, no resistan el efecto producido por un cambio drástico de la temperatura en un corto período de tiempo.

En cuanto a la respuesta superovulatoria sobre la base del número de embriones colectados, se observaron mejores resultados en la época de lluvias (3.9 embriones/vaca) cuando se compara con la de secas (2.9 embriones/vaca) demostrando que no existen diferencias ultraestructurales entre los embriones de buena, regular y mala calidad colectados en secas con respecto a los colectados durante la época de lluvias. Sin embargo, fue posible mostrar un efecto ( $p < 0.001$ ) al relacionar la calidad de los embriones con la época del año, en donde se observó que los embriones colectados durante la temporada de lluvias poseen menor número de células Tunel-positivas. A pesar de esto, no encontraron diferencias en cuanto a las características morfológicas de los embriones colectados en dos épocas. En base a estos resultados es importante plantearse la posibilidad de comparar el método de evaluación estereoscópica con métodos más sofisticados y precisos en embriones colectados en la temporada de lluvias y de secas, con la finalidad de corroborar si los errores de apreciación son mas acentuados en una de ellas. De ser así habría la necesidad de replantear el método de campo que se utiliza actualmente.

Todo lo anterior podría indicar una mayor viabilidad en embriones producidos cuando las condiciones del medio ambiente son favorables. En el presente trabajo se observó que existe un efecto estacional ( $p < 0,05$ ) sobre la producción y calidad de embriones en ganado *Bos Indicus*, siendo superiores los embriones colectados durante la época de lluvias. Aún así, los productores continúan realizando labores reproductivas y productivas como producción de

leche, empadres, inseminación artificial y sincronización farmacológica del estro durante todo el año, lo cual parece ser no muy conveniente de acuerdo a los estudios arriba mencionados. En efecto Galina y Arthur (1990) en una amplia revisión de literatura sobre el tema concluyeron que a pesar de que se planteen programas reproductivos todo el año los animales tienden a parir mayormente en la primavera

Al poner los embriones a prueba de su viabilidad y fortaleza metabólica por medio de la congelación y posterior evaluación al descongelarlos, las células en la época de lluvias mostraron un mejor índice de viabilidad en base al número de células apoptóticas presentes en su estructura. Durante esta época se confirmó que los embriones de buena y regular calidad colectados y congelados son ( $p < 0.05$ ) diferentes en el número de células Tunel positivo comparados con los colectados y congelados en la temporada de secas. Sorprendentemente, los embriones de buena calidad criopreservados en época de secas no presentan diferencias estadísticas cuando se comparan con los de regular calidad, colectados y congelados en lluvias, lo que nos indica que el material biológico de la época de lluvias es superior y posiblemente tienen mayores posibilidades de producir una gestación una vez transferidos. Hay que tomar en cuenta que este efecto puede ser debido a que durante esta época hay mayor disponibilidad de alimento el cual es además de mejor calidad.

En base a estos antecedentes, es importante recomendar que los programas de transferencia de embriones que se realicen en el trópico, concentren los trabajos inherentes a la colección y congelamiento de los mismos en la época de lluvias, lo que podría resultar en mejores índices de gestación. La evidencia encontradas en este estudio tienden a apuntar a que las transferencias también deberían de realizarse en la época de lluvias, ya que, los trastornos metabólicos que se observan en los embriones podrían estar ocurriendo en la receptora ya que la eficiencia reproductiva se ve afectada cuando las vacas son expuestas a condiciones ambientales adversas (Hansen *et al.*, 2001). A este respecto Putney *et al.*, (1988) encontraron que vacas Holstein superovuladas y mantenidas bajo condiciones de estrés térmico

presentaban una alta incidencia de retardo en el desarrollo y muerte embrionaria precoz.

Es innegable que serán necesarios otros experimentos para recomendar acciones más puntuales hacia el uso de la transferencia de embriones en condiciones tropicales en relación al la técnica de superovulación, el manejo de los embriones y la preparación de las hembras receptoras.

## VII. LITERATURA CITADA

1. Adams G. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and super-stimulation. *Therio*. 1994; 41: 19-24.
2. Aguila M. Comparación de dos técnicas (Estereoscópica y Ultraestructural) para la evaluación de embriones bovinos (Tesis de Licenciatura). México, D.F México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.
3. Baca L, Pérez E, Galina C. Comportamiento reproductivo de vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* bajo programas de inseminación artificial a estro sincronizado y natural en condiciones del trópico húmedo de Costa Rica. *Vet. Méx.* 1998, 29, 67-73.
4. Badinga L. Thatcher W, Diaz T, Drost M, Wolfenson D. Effect of environmental heat stress on follicular steroidogenesis and development in lactating Holstein cow. 1993; *Therio*. 39: 797-810.
5. Barros C, Pinheiro O, Valle E, Encarnação R, Figueiredo F. Acompanhamento ultra-sonográfico da ovulação inducida por syncromate B em vacas Nelore. *Arq. Facultd. Vet. UFRGS* 1996; 24: 225.
6. Byrne A, Southgate J, Brison D, Leese H. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J. Reprod. and Fert.* 1999;117:97-105.
7. Callesen H, Libroriousen T, Greve T. Practical aspects on multiple ovulation-embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 42: 205-214.
8. Comin A., Gerin D., Cappa A., Marchi V., Renaville M., Motta M., Fazzini U., Prandi A. The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cow. *Therio*. 2002, 58: 899-910.
9. Donnay I, Moens A, Dessy F. Bovine blastocyst development, apoptosis and metabolism following addition of glucosa at the morula state. *Therio*.1999, 51:236.
10. Fortune J. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility?. *Anim. Reprod. Sci.* 1993; 33: 11-125.
11. Gardner D and Leese H. Assessment of embryo viability prior to transfer by the no-invasive measurement of glucosa uptake. *J. Experiment. Zoo.* 1987; 18:97-105.



12. Ginther O, Knopf L, Kastelic J. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two or three follicular waves. *J. Reprod. and Fert.* 1989; 87: 223- 230.
13. Guilbault L, Grasso F, Lussier J, Rouillier P, Matton P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. and Fert.* 1991; 91: 81-89.
14. Hansen P, Drost M, Rivera R, Paula-López F. Adverse impact of heat stress on embryo production: cause and strategies for mitigation. *Therio.* 2001, 55:91-103
15. Kenjikimura, Hironobu S, Tooru S, Shizue M, Hiroshi N, Takayoshi T. 2000. Ultrastructure of cells undergoing apoptosis. *Vits. and Horm.* 58:257-265.
16. Kimura K, Sasano H, Shimosegawa T, Mochizuki S, Nagura H and Toyota T. Ultrastructure of cells undergoing apoptosis. *Vits. and Horm.* 2000, 58: 257-266.
17. Lehn-Jensen H, Rall W. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Therio.* 1981: 49-54.
18. Lerner S, Thayne W, Baker R, Hensche T, Meredith S. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 1986; 63: 176-183.
19. Lindsell CE, Murphy B, Mapletoft R. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Therio.* 1986; 26: 209- 219.
20. Manjo G. and Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995, 146: 3-15
21. Martínez L, Rubio I, Galina C. Diagnóstico de gestación temprano utilizando la ultrasonografía en vacas Cebú inseminadas artificialmente. En proceso (2000).
22. McDowell R. Crossbreeding in tropical areas with emphasis on milk, health and fitness. *J. Dairy Sci.* 1985; 68: 2418-2435
23. Molina J. Aceptación de la técnica de TE bovinos por parte de los productores adscritos al programa para el mejoramiento genético del estado de Chiapas. México, D.F México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2003

24. Monniaux D, Chupin D y Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Therio* 1983; 19:55-82.
25. Occhio M, Jillella D, Lindsey B. Factors that influence recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heiferes: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Therio*. 1999; 51: 9-35.
26. Pullan N. Condition scoring in Fulani cattle. *Tropic. Anim. Health* 1978, 10. 118-120.
27. Putney D; Drost M, Thatcher W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Therio*. 1988, 30: 195-209.
28. Romero A, Albert J, Brink Z, Seidel G. (Jr). Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. *Therio*. 1991; 35:265 .
29. Rutledge JJ. Use of embryo transfer and IFV to bypass effects of heat stress. *Therio*. 2001, 55:105-111
30. Shea B, Janzen R, McDermand D. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine-year period. *Therio*. 1984; 21: 186-195..
31. Teodoro R, Madalena F, Santos J, Mattos R, Lopés F, Pancarci S, Risco C. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Therio*. 2001; 55:75-89
32. Thibier M. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo-derived embryos transferred. A report of the IETS data retrieval committee. December 2000.
33. Tucker H. Seasonality in cattle. *Therio*. 1982; 17: 53-59.
34. Van Der Schans A, Van Der Westerlaken L, De Wet A, Eyestone W, De Boer H. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Therio*. 1991; 35: 288.
35. Winnberger-Torres S, Flechón JE. Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *J. Anatom.* 1974; 1:143-153
36. Zeitun M, Rodríguez H, Randel R. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Therio*. 1996; 45: 1577-1851

## VIII: ANEXOS

## Comparison of Stereoscopy, Light Microscopy and Ultrastructural Methods for Evaluation of Bovine Embryos

MM Aguilar<sup>1</sup>, CS Galina<sup>1</sup>, H Merchant<sup>2</sup>, F Montiel<sup>3</sup>, R Canseco<sup>3</sup> and YC Márquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Reproduction, FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México, México; <sup>2</sup>Department of Cellular Biology and Physiology, IIB, UNAM and <sup>3</sup>Department of Animal Reproduction, FMVZ, UNAV: Universidad Nacional Autónoma de Veracruz, México

### Contents

The most important point in embryo transfer success is the evaluation of the stage of development and quality of embryos. Therefore, the purpose of this study was to compare the morphological evaluation of embryos using stereoscopy, light microscopy and electron microscopy in order to establish the accuracy of former method compared with more invasive and accurate procedures. For this purpose, 23 Brahman × Swiss cows were used and synchronized with Norgestomet 6 mg plus, 5 mg Estradiol valerate (Syncromate B<sup>®</sup>, Rhone Merieux, Mexico, Mexico City) and superovulated with Folltropin-V 240 mg (Vetrepharm, Mexico, Mexico City). Non-surgical embryo collection was performed 7.5 days after insemination. Descriptive statistics analysis was used to assess the data. Seventy-eight embryos were collected and classified by stereoscopic microscopy, finding 51.2% (40) of good quality, 25.6% (20) fair and 24.3% (19) poor. Later, under light microscopy observation, evaluation of the same embryos resulted in 25.6% (20) good, 32.0% (25) fair and 42.3% poor quality. Finally, in the evaluation of embryos under electron microscopy 24.3% (19) were found to be of good quality, 29.3% (23) fair and 46.1% (36) poor. Evaluation of embryos with stereoscopic microscopy was found to be very subjective, as nearly 50% of embryos classified by this method as good quality, showed features of degenerative stages under light and electron microscopy. Embryos with these features are generally frozen and transferred, which could be one of the reasons for having low fertility rate in embryo transfer programmes.

### Introduction

Embryo transfer (ET) has been developed to optimize genetic improvement in cows and sires. However, one of the main hindrances has been the great variability in response to superovulation treatments, mainly in the number of collected embryos to be transferred (Boland et al. 1978; Elsdén et al. 1978; Goulding et al. 1991). Also, great differences have been found in the gestational rates obtained with the different protocols used in ET, (Elsden et al. 1978; Reichenbach et al. 1992; Greve et al. 1995; Schmidt et al. 1995; Silva and Machado 1996). Thus, there are great variations in the different protocols. These disparities have negatively affected the use of this method by a greater number of producers. The most important point in ET success is the evaluation of the embryonic developmental stage and quality (Linder and Wright 1983), and this is generally established through stereoscopic observation, which has not always shown to be an effective method for predicting fertility in different groups of embryos (Rondeau et al. 1995). In a study conducted by Farin et al. (1995), it was found that several experienced observers, after

evaluating 40 embryos, in different developmental stages and degree of degeneration, agreed only in 68.5% of the diagnoses, finding the greatest difficulty in differentiating embryos of good and fair quality. In another study, Rondeau et al. (1995), evaluated the metabolism of embryos, finding that in 47% of those considered to be of good quality, metabolic activity was abnormal, perhaps because of functional cytoplasmic or submicroscopic defects that cannot be detected by stereoscopic evaluation. This problem is even greater under tropical conditions, where, because of heat stress, the response to superovulation can be very variable resulting in a high number of abnormal or underdeveloped embryos (Kafi and McGowan 1997). Likewise, inclusion criteria for embryo transfer are less stringent. Therefore, another more thorough alternative to screen for the quality of embryos is to examine structures using electron microscopy, that although it is an invasive method, it would allow to establish accurately if there are potential degenerative changes in the embryo, in contrast to a previous favourable diagnosis. The objective of this work was to compare the accuracy of stereoscopic evaluation of embryo morphology vs light microscopy and electron microscopy which are invasive, yet more accurate methods.

### Materials and Methods

Field work was conducted in a commercial farm located in Pochotla, Veracruz, Mexico. The climate is classified as hot-humid without a specific dry season, rainfall is 1780 mm with an average temperature of 21.8°C, ranging between 13 and 40°C (García 1981).

Twenty-three Brahman × Swiss genotype cows older than 6 years were used with an average weight of 450 kg and a body score of 2.5–4 points (Pullan 1978). The cows were examined for anatomical or physiological disruptions that could affect fertility.

Treatment consisted in the application of two 6 mg ear implants of Norgestomet, plus a 5 mg injection of stradiol valerate and 3 mg of Norgestomet (Syncromate B, Rhone Merieux, Mexico) for 9 days. On the seventh and eighth day after the implants were removed, 240 mg of Folltropin-V were injected (Vetrepharm,) and on the ninth and tenth day 25 mg of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha were injected (Lutalyse, Upjohn). Oestrus was continuously monitored, starting 12 h after implant removal, and cows were artificially inseminated at 12 and 24 h after onset of oestrus.

Embryos were collected through uterine washings 7.5 days after the first insemination. The embryos were immediately evaluated by a qualified technician and classified as good, fair or poor quality according to the criteria described by Linder and Wright (1983). Once evaluated, the embryos in each category were subjected to ultrastructural analysis, for which they were fixed in modified Karnovsky (Karnovsky 1965) during 30 min, then placed in sodium cacodylate buffer, pH 7.4. A 1% osmium tetroxide solution was used in the laboratory for post-fixation and dehydrated in alcohol at increasing concentrations (70, 80, 90 and 100%) and embedded in EPON 812 (Pelco International, México City, México), to cut in 1 micron serial sections, stained with 0.5% toluidine blue and examined under light microscopy. These evaluations were made to determine where fine sections should be performed and also to classify embryos again, using the same criteria as with stereoscopic microscopy. Finally, based on these observations, fine sections were obtained for ultrastructure studies under electron microscope Jeol 110 (Jeol, Mexico City, Mexico), following Merchant and Chang's (1971) criteria.

Descriptive statistical analysis was used to estimate the rate of embryos classified as good, fair and poor with stereoscopy (fresh embryos), light microscopy (fixed embryos) and electron microscopy evaluations.

## Results

### Evaluation of embryos with stereoscopic microscopy

Seventy-eight embryos were obtained from 23 cows with an average of 0.14 unfertilized eggs and 3.3 embryos per cow, of which 51.2% (40) were classified as good quality, 24.3% (19) fair and 24.4% (19) poor (Table 1) at the time of evaluation. In Fig. 1(a), an example of an embryo in a blastocyte stage is depicted, classified as good quality and showing features according to the age at collection day, also with proper morphology such as compact blastomeres with polygonally shaped and amber colour devoid of conspicuous vesicles and with no damage in the zona pellucida. On the other hand, fair quality embryos were irregularly shaped and white granules were identified inside the blastomeres that could be lysosomal vesicles. There were few extruded blastomeres and cellular debris in the perivitelline space, no alterations were found in the zona pellucida (Fig. 1b). Poor quality embryos (non-transferable) appeared to have marked degeneration, small cell mass, underdevelopment, abundant cellular debris and extruded blastomeres, plus a dark colour (Fig. 1c).

### Evaluation of embryos with light microscopy

Once the first fine sections were obtained, light microscopy was used for evaluation. Good quality embryos

Table 1. Rates of embryos of different categories evaluated by the three methods

	Good (%)	Fair (%)	Poor (%)	Total embryos
Stereoscopic microscopy	40 (51.2)	19 (24.3)	19 (24.3)	78
Light microscopy	20 (25.6)	25 (32.0)	33 (42.3)	78
Electron microscopy	19 (24.3)	23 (29.4)	36 (46.1)	78

were found in 25.6% (20), 32.0% (25) fair and 42.3% (33) poor (Table 1).

Regarding morphology, good quality embryos were round and symmetrical, with cells of the same type, well-defined blastomeres with very few or no white vesicles, and no extruded cells. In the blastomeres, nuclei were easily distinguishable and the zona pellucida was undamaged (Fig. 1d).

Figure 2(d) shows an embryo classified as fair quality. In the blastomeres, spaces devoid of structures were noted, white vesicles increased in number compared with the embryos in the previous group. Blastomeres were well outlined, with good adhesion among them and with conspicuous nuclei.

Finally, in embryos classified as poor quality, blastomeres were remarkably separated among them and of different sizes, they also had numerous extruded blastomeres, poor nuclei definition, large solid coloured spaces (cytoplasm) with no structures and abundant white vesicles. No defects were found in the zona pellucida (Fig. 1e).

### Evaluation of embryos with electron microscopy

With electron microscopy evaluation, 24.3% (19) embryos were classified as good quality, 29.4% (23) fair and 46.1% (36) poor (Table 1). Among ultrastructural features of embryos classified as good quality, blastomeres were well outlined, nuclei with heterochromatin and some showed evidence of having initiated cell division. Also, there were a few round-shaped fat vesicles. Mitochondria were round and/or elongated, with mitochondrial crystals of different shapes and lengths located near the nucleus. In the cytoplasm, the scanty lysosomes were seen as irregularly shaped vesicles, with borderline membranes with clusters of differently shaped granules inside that were cellular debris (Fig. 2). When these embryos were evaluated with greater magnification (Fig. 3), cellular junctions could be seen (desmosomes) as two electron dense plates were made of cytoplasmic thin filaments. The cytoskeleton was well developed, looking like fine filaments spreading along the width of the blastomere. Also, ribosomes were seen as dark pinpoints.

In Fig. 4, an embryo classified as fair quality is shown. Blastomeres are well outlined by their cytoplasmic membrane, nuclei have heterochromatin, with evidence of having started cell division. In the cytoplasm there is a greater amount of lysosomes, as well as fat vesicles, some of the mitochondria showed structural damage. Likewise, blastomeres showed to be phagocytosing degenerated cells, which could be a sign of programmed cell death (apoptosis).

In embryos classified as poor quality, there were no clear-cut borders between blastomeres, because several times they lost their cytoplasmic membrane and fused, appearing as a blastomere with two nuclei surrounded by abundant lysosomes. Also, it was common to see spaces in the cytoplasm devoid of organelles and when compared with good quality embryos, there was a decrease in the amount and size of microvilli. Fat vesicles were of different shapes, very abundant and almost always associated with lysosomes. Mitochondria became

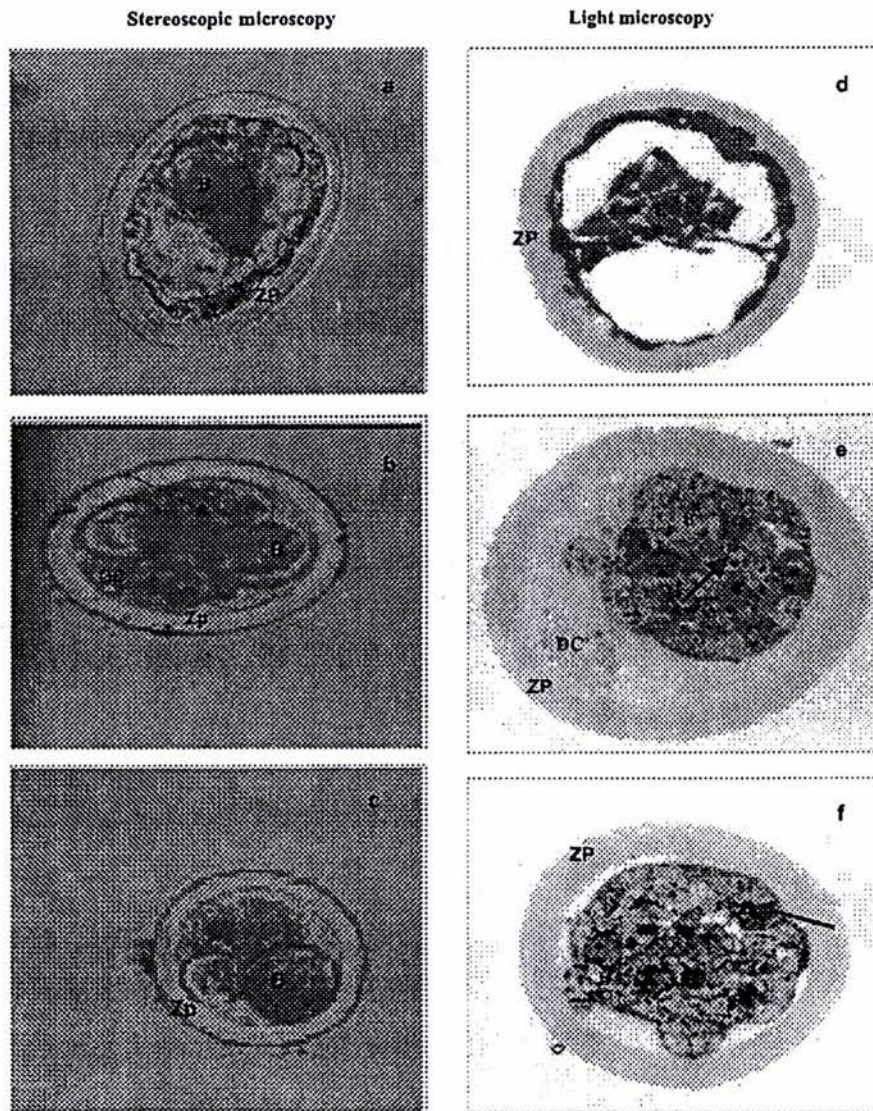


Fig. 1. Bovine embryos of different quality: (a) 8d397 - good; (b) 4d397 - fair; (c) 7d937 - poor; (d) Good 8d397, blastomeres well-outlined; (e) 4d397 - fair, blastomeres white vesicles increased in number; (f) 7d397 - poor quality, blastomeres remarkably separated and of different sizes, numerous extruded blastomeres, abundant white vesicles. Zp = zona pellucida; B = blastomeres arrows-liosomal vesicles; DC = cellular detritus

ill-defined. Often abundant blastomeres were seen with phagocytic activity, as in the previous group (Fig. 5).

#### Comparison of evaluations

In Table 1, rates of embryos of different categories evaluated by the three methods are presented. As noted, 40 embryos were classified as good quality at the time of collection using stereoscopic microscopy. However, when classified by light microscopy, that number decreased to 20 and finally, with electron microscopy to 19. In case of fair quality embryos, fresh evaluation yielded 20, increasing to 25 when they were fixed and finally this number decreased slightly to 23 with electron microscopy. In embryos classified as poor quality, 19

were seen with fresh evaluation, 33 when fixed and 36 with electron microscopy.

It is important to emphasize that variations between the different methods and classification seem to be random because no specific order can be seen as there are not only changes in embryos classified as good quality to fair and from fair to poor, but also changes from poor to fair and from fair to good quality. It can also be underscored that 20% of embryos classified as good quality in fresh evaluation were later classified as fair or poor under light and electron microscopy. Finally, it was found that 27% of embryos classified as good quality in the fresh evaluation, were fair or poor quality by electron microscopy. In contrast, poor quality embryos increased 21.8% when electron microscopy was used for the evaluation.

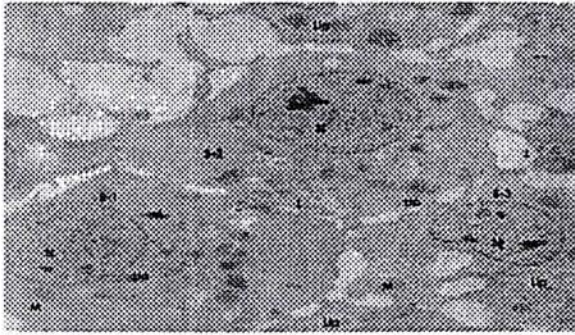


Fig. 2. Good quality embryo. 8d397 (HM3309, 2500x) = blastomeres are well outlined (3) few round shaped fat, mitochondria are round and/or elongated, cells are firmly bound. B = blastomeres; N = nuclei; Cr = chromatin; Lip = fat vesicles; L = lysosomes; M = mitochondria

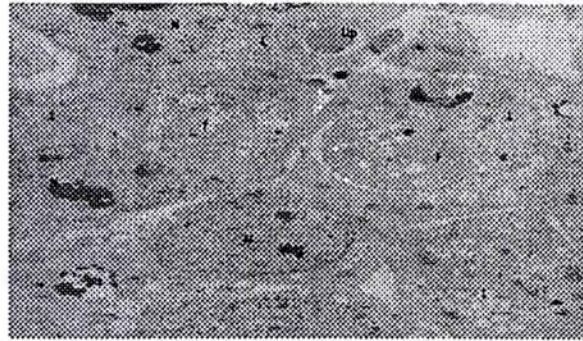


Fig. 5. Poor quality Embryo. 7d937 (HM3391, 2500x) = The number of phagosomes (F) are increasingly present, note the presence of blastomeres indicating a continuous phagocytic process

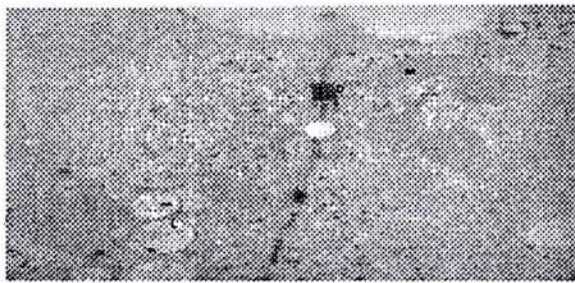


Fig. 3. Good quality embryo. 8d397 (HM3377, 12000x) = Desmosomes (D) can be seen as electron dense plates. Ribosomes (R) are depicted as dark pinpoints and mitochondria (M) are observed elongated and well defined



Fig. 4. Fair quality embryo. 4d397 (HM3327, 2500x) = Blastomeres are well outlined by their cytoplasmic membrane and with cellular junctions still bound together. The lipid vesicles and lysosomes are present in considerable numbers. Also, there is a decrease in the amount and size of microvilli. Epv = perivitelline space; Mic = microvilli; N = nuclei; Cr = chromatin; Lip = fat vesicles; L = lysosomes

## Discussion

Quality evaluation of fresh embryos agrees with that of Shea (1981), who found that good quality embryos have spherical shape, amber colour and no disruption of the

zona pellucida, fair quality embryos may have small defects in the zona pellucida and also extruded blastomeres and cellular debris, and poor quality embryos show a great amount of damaged blastomeres in a degenerative process as well as cellular debris. As far as the results of the evaluation of semi fine sections by light microscopy, there are similarities with those reported by Albihn et al. (1990), who found good quality blastocysts, a clear differentiation among trophoblastic cells, inner mass cells and blastocoles. Also, a great amount of intercellular junctions were seen. In fair and poor quality embryos, our results agree with those of Mohr and Trounson (1981), Hyttel et al. (1986), however, these last authors point to disturbances in the zona pellucida of poor quality embryos, that were not found in our study.

Morphology of embryos classified as good quality under electron microscopy evaluation is in accord with reports in other papers (Fléchon and Renard 1978; Hyttel et al. 1986; Mohr and Trounson 1981; Chartrain and Picard 1988; King et al. 1992), who found that good quality embryos have well defined blastomeres with dense and well localized chromatin and few fat vesicles.

In the group of embryos classified as fair quality, Hyttel et al. (1986), Chartrain and Picard (1988), Shamusddin and Rodriguez-Martinez (1994), describe them as having well outlined blastomeres, heterochromatin in nuclei, round and/or elongated shaped mitochondria, abundant fat and lysosomal vesicles, thereby cell fragmentation and phagocytosis of degenerated cells starts to be noted indicating apoptosis (Vaux and Strasser 1996; Ferri and Kroemer 2000; Betts and King 2001). In our laboratory we have detected apoptosis in bovine embryos of good, fair and poor quality using TUNEL technique, noting apoptotic nuclei and bodies in the three types of embryos; however, the number of cells with these apoptotic characteristics in terms of the number of viable cells is greater in embryos of fair and poor quality. These preliminary results tend to support ultrastructural evidence found in the present study. Also, the above mentioned authors have described blastomeres with spaces devoid of any cellular structure in fair quality embryos as well as a smaller number of junctions between blastomeres, appearing as separated.

Microvilli are shorter and less abundant, which could create disruption in the nutritional processes of the embryo. These features are a good indication that an embryo transferred with such characteristics has little chance to establish a pregnancy in spite of the fact that during the stereoscopic evaluation the embryo would have been selected for ET.

Embryos classified as poor quality showed the following specific features: poorly outlined blastomeres, obvious phagocytosis and they even lost their nuclear membrane (Hyttel et al. 1986; Chartrain and Picard 1988; Shamusddin and Rodriguez-Martinez 1994). As in the above mentioned papers, Karnovsky fixative was used for the embryo preservation process because it is considered as one of the best medium for having a mixture of formaldehyde and glutaraldehyde, with which the first quickly penetrates stabilizing the cellular structures, that are subsequently better preserved with glutaraldehyde (Karnovsky 1965). During this work we found that evaluation of embryos by light and electron microscopy (fixed embryos) helps to verify that embryos classified as poor quality with stereoscopic microscopy actually have morphologic features that prove so. Likewise, embryos classified as good quality, showed features of embryos undergoing degeneration using this method.

Regarding comparison between fresh embryo evaluations with semi fine sections (light microscopy) or ultra fine sections (electron microscopy), some differences were mainly found in the evaluation of fresh and fixed embryos. This can be explained by the difficulty involved in fresh embryo evaluation, because the resolution of the stereoscopic microscope does not allow distinguishing structures that provide valuable information. Also, the classification depends on the ability of the observer, who in spite of having experience in the field of embryo evaluation; as was the case in this study – it is still always a subjective method. Results from this study with fresh embryo evaluation agree with the study conducted by Farin et al. (1995), in which several experienced observers evaluated 40 embryos in different stages of development and degeneration with agreement only in 68.5% of the diagnoses, finding greater difficulty in differentiating embryos of good and fair quality. In the present study, there were embryos classified as good quality in the fresh embryo evaluation that in the subsequent evaluations by light and electron microscopy were classified as poor; so in theory, when this sort of embryos are transferred, chances of gestation remarkably decrease. This fact could explain why in Chartrain and Picard's (1988) study there were 31% pregnancy rates in embryos considered of poor quality and no pregnancies in 37% of embryos considered of good quality. These same observations were reported by Elsdén et al. (1978), indicating that embryos when transferred classified as poor quality by light microscopy even resulted in 12% pregnancies. This situation is even worse in the tropics, where a large amount of fair quality embryos are transferred because of the low rate of embryos collected. No doubt this has a negative impact on gestation rates that, according to Galina and Arthur (1990) are 30% in the tropics.

Based on these results it can be concluded that the evaluation of embryos using stereoscopic microscopy was very subjective, because almost 50% of embryos classified by this technique as good quality, when evaluated by light and electron microscopy were considered to be cells in a degenerative stage. These embryos are generally transferred, which could be the reason for the low fertility rate seen in embryo transfer programmes. Therefore, it becomes necessary to find alternative non-invasive techniques to evaluate embryo viability before transfer to improve programmes and thus increase their commercial value.

## References

- Albihn A, Rodriguez-Martinez H, Gustafsson H, 1990: Morphology of day 7 bovine demi-embryo during *in vitro* reorganisation. *Acta Anat* 138, 42–49.
- Betts DH, King WA, 2001: Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 55, 171–191.
- Boland MP, Crosby TF, Gordon I, 1978: Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology* 10, 175–181.
- Chartrain I, Picard L, 1988: Ultrastructural analysis of bovine embryos at days 6 to 8: correlation with embryo quality. *Theriogenology* 29, 236.
- Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE, 1978: Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* 9, 17–26.
- Farin PW, Britt JH, Sahw DW, Slenning BD, 1995: Agreement among evaluators of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology* 44, 339–349.
- Fléchon JE, Renard JP, 1978: A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fertil* 53, 9–12.
- Ferri K, Kroemer G, 2000: Control of apoptotic DNA degradation. *Nat Cell Biol* 2, E63–E64.
- Galina CS, Arthur GH, 1990: Review on cattle reproduction in the tropics. Part 5. Fertilization and pregnancy. *Anim Breed (Abstracts)* 58, 805–813.
- García E, 1981: Modificaciones al sistema de clasificación climática Koeppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Goulding D, Williams DH, Roche JF, Boland MP, 1991: Superovulation in heifers using either pregnant mare's serum gonadotropin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology* 36, 949–958.
- Greve T, Callesen H, Hyttel P, Assey R, 1995: The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43, 41–50.
- Hyttel P, Lehn-jensen T, Greve T, 1986: Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by a two-step freezing method. *Acta Anat* 125, 27–31.
- Kafi M, McGowan MR, 1997: Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 48, 137–157.
- Karnovsky MJ, 1965: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27, 137.
- King WA, Shepherd DL, Plante L, Powell R, Looney CR, Barnes FL, 1992: An ultrastructural study of bovine embryos produced by nuclear transfer. *Theriogenology* 37, 238.
- Linder GM, Wright RW, 1983: Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 29, 407–416.



- Merchant H, Chang M, 1971: An electronic microscopic study of mouse eggs matured *in vivo* and *in vitro*. *Anat Rec* **171**, 21-38.
- Mohr LR, Trounson AO, 1981: Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod* **25**, 1009-1025.
- Pullan NB: Condition scoring of white Fulani cattle. *Trop Anim Health and Prod.* **10**, 118-120.
- Reichenbach HD, Liebrich J, Berg U, Berm G, 1992: Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J Reprod Fertil* **95**, 636-370.
- Rondeau M, Guay P, Goff AK, Cooke GM, 1995: Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. *Theriogenology* **44**, 351-366.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB, 1995: Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* **44**, 527-539.
- Shea BF, 1981: Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* **15**, 31-35.
- Silva AP, Machado EA, 1996: Eficacia de diferentes productos comerciais superovulatorios en programa de T.E em um rebanho Nelore/Nelore mocho. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS* **41**, 214-216.
- Shamusddin M, Rodriguez-Martinez H, 1994: Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *J Vet Med* **41**, 307-316.
- Vaux DL, Strsse A, 1996: The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 2239-2244.

Authors' address (for correspondence): Carlos Galina. Apartado postal 070, Mexico 22 D.F. 1400, Mexico. E-mail: cgalina@servidor.unam.mx