



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**INFLUENCIA DEL SANGRADO DURANTE LA
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DE RATA**

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

JOSE EDUARDO FAVELA REYES

**Directores de Tesis: BIOL. RAUL ASTIAZARAN. Y.
M.V.Z. ARTURO TREJO GONZALEZ**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

I N D I C E

I RESUMEN.-----	1
II INTRODUCCION.-----	4
A) Método de Transferencia.-----	8
B) Aspectos de la Transferencia de Embriones.--	10
C) Células Sanguíneas.-----	11
D) Fluidos Uterinos. -----	21
III OBJETIVOS.-----	25
IV MATERIAL Y METODOS.-----	26
A) Obtención de Embriones.-----	26
B) Medio de Colecta.-----	27
C) Transferencia de Embriones. -----	27
D) Efecto del Sangrado en el Desarrollo Embrionario. -----	31
E) Efecto del Sangrado en la Viabilidad Embrionaria. -----	32
F) Registro Fotográfico. -----	32
V RESULTADOS Y DISCUSION.-----	34
A) Desarrollos Fetales. -----	34

<i>B) Alteraciones Uterinas.</i>	39
<i>VI CONCLUSIONES.</i>	43
<i>VII BIBLIOGRAFIA.</i>	45

I R E S U M E N

Uno de los aspectos más importantes para el éxito de la transferencia de embriones es el control de las variantes tanto físicas como biológicas que puedan influir en la viabilidad de los embriones. Una de estas variables es el sangrado del cuerno uterino en el momento de la introducción de la pipeta de trnsferencia, el cual no siempre es posible evitarlo, por lo que se planteo el objetivo de estudiar la posible influencia de la hemorragia durante la implantación, en el desarrollo posterior de los embriones.

Se transfirieron un total de 202 embriones de rata en el estadio de blastocisto a 26 hembras receptoras, las cuales se dividieron en 4 grupos. 20 hembras en 2 grupos: experimental y control, las 10 receptoras del grupo experimental recibieron 1 μ l de sangre después de haber introducido los embriones en el cuerno uterino.

Las 10 receptoras del grupo control recibieron 1 μ l de medio de transferencia después de haber trans

ferido los embriones al cuerno uterino.

Los resultados se observaron al sacrificar los animales 15 días después de la operación obteniendo lo siguiente : El porcentaje de desarrollo fetal fue menor cuando las transferencias fuerón acompañadas con sangre (36.2%), sin embargo fue mayor cuando no lo fuerón (67.5%). Así mismo se encontró un incremento en el desarrollo de infecciones uterinas alcanzando un (40%) y reacciones deciduales (70%) como resultado de la presencia de un sangrado durante las transferencias del grupo experimental.

Las 6 receptoras restantes se dividieron en 2 grupos : 3 hembras en el grupo experimental y 3 hembras del grupo control, básicamente se realizó el mismo método, únicamente con la diferencia que estos animales se sacrificarón a las 10 horas después de la transferencia, para recuperar los embriones, para poder realizar un análisis fotográfico de estos teniendo como resultado en las fotografías, adosamiento de los leucocitos y fagocitosis de leucocitos contra los embriones.

De los resultados de los 4 grupos anteriores, se puede concluir que la fertilidad de una hembra se vera sumamente disminuida si en el momento de la transferencia de los embriones esta va acompañada de un sangrado profuso como consecuencia de la introducción de los embriones.

II I N T R O D U C C I O N

De 1891 cuando Heape reportó por primera vez la transferencia de un embrión de conejo del tracto reproductor de una hembra al de otra, a 1971 la transferencia de embriones quedó como instrumento de laboratorio usado para estudiar el proceso de reproducción (7,17).

Cuando las razas europeas de doble propósito tales como el Limousin y el Simental, se pusieron de moda en Norte América, Australia y Nueva Zelanda, los intereses ganaderos ofrecieron grandes incentivos económicos a los veterinarios y a las personas dedicadas a la ciencia animal para desarrollar la transferencia de embriones como instrumento de reproducción (?).

Fue así que la tecnología de la transferencia de embriones se desarrolló como un producto comercial y no con fondos para la investigación que provinieran del gobierno, sino con recursos de los criadores de ganado y especuladores. La demanda sobrepasó la sofisticación y madurez de la tecnología, el valor genéti-

co de las donadoras y el efecto de la tecnología en la normalidad de las crias no se puso en duda (27).

A la fecha, más del 90% de la actividad comercial de la transferencia de embriones ha sido hecha en ganado bovino, sin embargo el potencial de la técnica también ha captado el entusiasmo y la imaginación de los criadores de otras especies animales y de los conservacionistas preocupados por la preservación de especies en peligro de extinción (27).

La historia de la transferencia de embriones ha sido el reverso de la gran mayoría de las tecnologías en cría de animales, ya que la demanda por los usuarios y la promoción por los científicos y educadores ha sido el estímulo mayor para su crecimiento. Esta tecnología, como muchas otras se ha vuelto un instrumento útil y económicamente justificable para los criadores (7).

El crecimiento continuo de la industria parece asegurado, ya que la transferencia de embriones es un paso clave para tecnologías en desarrollo. La transfe

rencia de embriones, ofrece a los ganaderos posibilidades que resultarán en alimentos más accesibles y derivados de mayor calidad. Aunque el impacto es mucho menor que el de la inseminación artificial, respecto al mejoramiento genético y la multiplicación sobre la población, ciertas aplicaciones de la transferencia de embriones puede resultar en un ahorro de tiempo impresonante, permitiendo en un sola generación lo que toma muchos años con programas de crianza convencionales. Así los ganaderos y consumidores tanto de productos animales como de recursos conservados son los grupos más importantes que se beneficián con la técnica antes mencionada (7,20).

La transferencia de embriones, es usada tanto por los ganaderos que dependen de la cría de animales como su ingreso más importante, como por los que crían animales por afición, inversión o aventura especulativa. Esta técnica es costosa e involucra un riesgo financiero considerable, por estas razones su aplicación primordial por el momento, es la producción de pies de cría para posteriormente ser promovidos y puestos al mercado por personas con mayor liquidez de

capital, sin embargo conforme la tecnología mejora y su costo declina un número cada vez más de criadores a pequeña escala están utilizando la transferencia de embriones en forma limitada (27).

Los países en desarrollo son capaces de desarrollar rápidamente sus hatos nacionales, importando embriones de las razas y pedigrées deseados. Aquellos que proporcionan los servicios para la transferencia de embriones se benefician de esta tecnología, así como muchas industrias relacionadas o del ramo (20).

La transferencia de embriones en bovinos al igual que la inseminación artificial es una técnica para la manipulación genética. La ventaja primordial de la transferencia de embriones es aumentar la capacidad reproductiva en una ternera o vaca valiosa. Aunque no es un instrumento genético tan poderoso como la inseminación artificial puede reducir el intervalo generacional entre los pasos de la selección, proporcionando un gran porcentaje de progente de donadoras jóvenes. En algunos casos, la transferencia de embriones permite que vacas infértiles debido a enfermedad,

heridas, o edad, tengan crías o se les pueda implantar embriones (22).

El procedimiento convencional para la transferencia de embriones consiste en tratar a una donadora con hormonas, las cuales inducen la maduración y ovulación de folículos (superovulación), los óvulos liberados y fertilizados son removidos de la donadora y transferidos a vacas receptoras para llevar la gestación a término (27).

La técnica involucra una serie de pasos que son simples, pero que requieren de personal capacitado.

A) Métodos de Transferencia de Embriones.

Existen tres métodos para transferir embriones : dos quirúrgicos y uno no quirúrgico

Los métodos quirúrgicos constantemente proporcionan los índices más elevados de preñez, pero algunos técnicos experimentados obtienen preñeces similares con los métodos quirúrgicos y no quirúrgicos (22).

La anestesia general seguida de una cirugía en línea media fue el primer método usado para transplante de embriones, pero se necesita un cirujano competente e instalaciones adecuadas para la cirugía, esto limita dicho procedimiento (5, 22, 25).

La segunda técnica para transferencia de embriones, consiste en operar al animal parado usando solamente anestesia local. Este método puede ser usado en el campo y el porcentaje de preñez es más bajo que el que se obtiene por anestesia general pero hay una incidencia menor de los siguientes problemas :

- 1) Dificultad en exteriorizar el cuerno uterino y causar daño a este especialmente en vaquillas, animales sin dieta previa, receptoras gordas o muy grandes.
- 2) Riesgo de infecciones post-operatorias (10, 22).

El tercer método es el no quirúrgico a través del cérvix. El porcentaje de preñez es más bajo, las causas son por : introducción de alguna infección, expulsión del embrión o depositar el embrión en una parte del útero que no es la óptima (34, 38, 39).

En la técnica de transferencia de embriones quirúrgica es muy importante que al punccionar la parte anterior del cuerno uterino para introducir el embrión se busque un lugar que no este muy vascularizado ya que de lo contrario se corre el riesgo de producir un sangrado el cual va a afectar la sobrevivencia e implantación del embrión (43).

B) Aspectos de la Transferencia de Embriones.

Uno de los aspectos más importantes de la transferencia de embriones, es el control de las variantes tanto biológicas como físicas, las cuales pueden influir en la viabilidad del embrión (10).

Dentro de las variables se encuentran :

- 1) Exposición del embrión a la luz (9).*
- 2) Variaciones de temperatura (8,9).*
- 3) Acides y alcalinidad del medio (9).*

- 4) Osmolaridad del medio de colecta (9).
- 5) Contaminación con hongos o bacterias (2,11,21,30).
- 6) Utilización de sueros contaminados o inactivados (11,30).
- 7) Influencia del sangrado en el cuerno uterino durante la introducción de los embriones (13,24,35).

Existen otras variantes ajenas, pero de igual importancia que influyen en la implantación del embrión en el lumen uterino de la hembra receptora y estos son : el manejo del animal, alimentación, calidad, estado de salud, peso, etc. Así como la experiencia y habilidad del técnico en la manipulación del embrión durante el programa de transferencia (36).

C) Células Sanguineas.

Los leucocitos son células móviles del sistema inmunocompetente, se forman en parte en la médula ósea (granulocitos), y en parte en los ganglios linfáticos (linfocitos y monocitos), pero después de pro-

ducidos son transportados por la sangre a diferentes partes del cuerpo, donde ejercen sus funciones (15).

El valor fundamental de los glóbulos blancos estriba en que pueden transportarse a zonas donde hay inflamación intensa, propiciando así una defensa rápida y enérgica contra cualquier agente infeccioso además el número de glóbulos blancos existentes en la circulación, y sus características pueden cambiar rápidamente con el fin de ayudar al proceso defensivo (14).

1) Características Generales de los Leucocitos.

Normalmente se encuentran en la sangre cinco tipos diferentes de glóbulos blancos : polimorfonucleares neutrófilos, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, monocitos y linfocitos. Además hay gran número de plaquetas que son fragmentos de otro tipo de células (megacariocito) que tienen origen en la médula ósea (23,26).

Los tres tipos de células polimorfonucleares tie-

nen aspecto granuloso, es la causa por la que se les conoce como granulocitos (14).

Los granulocitos del orden de los neutrófilos protegen al cuerpo contra germenos invasores captándolos, por el proceso que se denomina fagocitosis. Una función de los ganglios linfáticos y linfocitos es producir monocitos, que a su vez destruyen germenos invasores. (14).

Finalmente las plaquetas, que su función primordial es iniciar el proceso de coagulación, siendo este otro mecanismo de hemostasis importantísimo (15).

2) Propiedades de los Leucocitos.

a) Diapedesis. Los glóbulos blancos pueden deslizarse a través de los poros de los vasos sanguíneos por un proceso de diapedesis, a pesar que los poros son mucho menores en su diámetro que el volumen de la célula, una pequeña parte de esta se desliza a través del mismo, y la porción que se desliza esta momentáneamente constreñida hasta las dimensiones del poro (14).

b) *Movimiento Amiboide.* Una vez que las células han alcanzado los espacios tisulares, los polimorfonucleares sobre todo, y en menor grado los linfocitos y monocitos, se desplazan a través de los tejidos con movimiento amiboide, se mueven con una velocidad de 40 μm por minuto (14).

c) *Quimiotaxis.* Cierta número de sustancias químicas colocadas en los tejidos hacen que los leucocitos se alejen y se acerquen a la fuente de tales productos químicos, este fenómeno recibe el nombre de quimiotaxis. Los productos degenerativos de tejidos inflamados, especialmente polisacaridos tisulares, pueden hacer que los neutrófilos se desplacen hacia la zona donde hay inflamación (15).

Los factores quimiotácticos para neutrófilos incluyen sustancias liberadas por varias clases de virus y bacterias : una fracción de proteasa desdoblada de quinto y tercer componentes del complemento ; un complejo trimolecular de complemento (C'5, C'6, C'7); productos de degeneración de colágena, componente del sistema de la cinina, que incluye la calicreína una

enzima, y activador de plasminógeno, y un fibrinopéptido liberado a partir de fibrinógeno por la acción de la trombina. Los agentes quimiotácticos que actúan sobre monocitos y macrófagos incluyen; fragmentos de C'3 y C'5, factores bacterianos, formas L (protoplastos), calicreínas y activador del plasminógeno y fracciones de linfocitos y neutrófilos. Merece la pena señalar que los neutrófilos, posiblemente los péptidos básicos de sus granulos lisósomios, tienen papel importante en la formación de agentes quimiotácticos para los macrófagos. Aquí pudiera estribar la explicación de que los neutrófilos son la primera oleada de migración leucocitaria, seguidos de monocitos (19,45).

También diversas toxinas bacterianas pueden producir quimiotaxis para algunos leucocitos. Algunas de estas toxinas pueden ejercer quimiotaxis positiva lo cual significa que atraen glóbulos blancos hacia la fuente de la toxina, otras causan quimiotaxis negativa, lo que significa que repelen los leucocitos desde la fuente de la toxina (15).

La quimiotaxis depende de un gradiente de concenu

tracción existente en la sustancia quimiotáctica. La concentración de dicho agente es máxima en las cercanías de su origen, y al esparcirse por difusión alejándose de dicho origen la concentración disminuye, en caso de quimiotaxis positiva la mayor concentración en un lado de la célula origina la proyección de seudópodo hacia la fuente del agente (14).

d) Fagocitosis. La función más importante de los neutrófilos y monocitos es la fagocitosis, o sea la ingestión de partículas por las células. Cuando estas células entran en contacto con materia extraña en los tejidos o en el torrente sanguíneo, se produce con gran rapidez el fenómeno de fagocitosis, las partículas atraviesan la membrana celular hacia el interior del fagocito en una centésima de segundo (26,41).

Evidentemente los fagocitos han de poder seleccionar el material fagocitado, de lo contrario serían ingeridas estructuras del propio cuerpo. Que se produzca o no fagocitosis dependerá sobre todo de tres métodos de selección. En primer lugar si la superficie de una partícula es áspera, aumenta las probabili

dades de fagocitosis, una partícula lisa es muy resistente a la misma. En segundo lugar, la mayor parte de sustancias naturales del cuerpo tienen carga de superficie electronegativa, en consecuencia son repelidas por fagocitos. En tercer lugar el cuerpo tiene medio para promover la fagocitosis de todos los materiales extraños combinando selectivamente las partículas extrañas con moléculas de globulina denominadas opsoninas. Después que las opsoninas se han combinado con la partícula, la globulina permite la adherencia del fagocito a la superficie de dicha partícula lo cual facilita la fagocitosis (41).

Una vez que han abandonado el sistema circulatorio y han penetrado en los tejidos, los monocitos se hinchán progresivamente durante las pocas horas siguientes y se transforman en macrófagos, que luego resultan fagocitos mucho más poderosos que los neutrófilos, estos macrófagos tienen la capacidad de rodear unas partículas mucho mayores, en ocasiones cinco veces o más que las partículas que logran fagocitar los neutrófilos (15).

Estos macrófagos llegan a fagocitar glóbulos rojos completos o parasitos del paludismo, mientras los neutrófilos no son capaces de fagocitar partículas mayores que una bacteria (15).

Los macrófagos tambien tienen capacidad mucho mayor que los neutrófilos de fagocitar tejido necrotico, función muy importante efectuada por estas células en caso de infección crónica (14).

Las ocasiones en que se presenta una inflamación crónica y esta dura semanas o meses, como ocurre en la tuberculosis y en la salpingitis crónica (infección) por ejemplo, la concentración de monocitos en la sangre puede aumentar . El motivo de ello se desconoce, aunque se cree que depende de que gran número de linfocitos al penetrar en los tejidos inflamados se transforman en macrófagos, que más tarde siguen por la sangre, donde adoptan las características de monocitos. Además de la respuesta celular fagocitica en la inflamación crónica, hay una respuesta de tipo inmunologica humoral que esta dada por linfocitos B y linfocitos T, para que esta respuesta se cumpla se necesita

el antígeno, el cual se pega a la inmunoglobulina superficial de la célula B y esta se empieza a dividir y diferenciarse, dando lugar a células plasmáticas y células memoria y estas células producen inmunoglobulinas (Ig G, Ig A, Ig E), esta respuesta solo se presenta en ciertas circunstancias ya que solo aparece en presencia de células T y macrófagos. Las células T ayudantes liberan sustancias como una Ig M 7S (monomérica) y los macrófagos liberan monocinas, sustancias que producen la respuesta óptima de las células B. Todas estas respuestas y la fijación del complemento están encaminadas a producir la eliminación parcial o total del antígeno ya sea virus, bacteria, parásito, toxina o alguna célula extraña (injertos) (14, 41).

3) Digestión Enzimática en los Leucocitos.

Cuando una partícula extraña ha sido fagocitada la célula empieza inmediatamente a digerirla. Tanto los macrófagos como los neutrófilos en los lisosomas tienen enzimas proteolíticas especialmente dispuestas a digerir bacterias y otras materias proteicas extrañas. Los macrófagos también contienen grandes can-

tidades de lipasas en sus lisosomas, que digieren las espesas membranas lipoides que rodean las bacterias de la tuberculosis, la lepra y otras (15).

Además de las enzimas que digieren partículas ingeridas, las células fagocíticas contienen también agentes bactericidas, que matan bacterias antes de que puedan reproducirse y destruir al propio fagocito, aquí se incluye una producción de peróxidos, por los neutrófilos, siendo muy eficaz pues la energía que utilizan durante la fagocitosis proviene de la activación del llamado "corto circuito del monofosfato de hexosa". Esta vía metabólica origina la aparición de NADP (fosfato de nicotinamida adenin dinucleotido oxidado), a reducido ($NADPH_2$), que se vuelve a utilizar dando lugar a la aparición de peróxidos. Estos peróxidos, en unión con distintos haluros (Cl, Br o I) y de la enzima mieloperoxidasa forman compuestos bactericidas de gran potencia. También existe lisozima en los lisosomas del neutrófilo en cantidades considerables, esta desdobla los acilaminopolisacáridos de las paredes celulares de ciertas bacterias grampositivas con lo cual las mata. También puede intervenir en la des-

trucción de ciertos microorganismos gramnegativos, en unión del complemento (41,23).

Los fagocitos continúan ingiriendo y digiriendo partículas extrañas hasta que dentro del citoplasma de los mismos se acumulan cantidades suficientes de productos de desintegración en las partículas al punto de causarles la muerte. Así los neutrófilos son capaces de fagocitar de cinco a veinticinco bacterias antes de morir el mismo, pero un macrófago en ocasiones incluye hasta cien bacterias antes de morir (14).

D) Fluidos Uterinos.

En la industria ganadera las infecciones intrauterinas son una de las principales causas de grandes pérdidas económicas (13).

El ambiente intrauterino juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario, por eso se han realizado estudios encaminados a determinar que algunas sustancias podrían influir en dicho desarrollo. De las secreciones uterinas investigadas, las proteínas

parecen influir en mayor medida sobre el crecimiento embrionario (32).

Tanto en la coneja como en la cerda se ha visto la existencia de secreciones uterinas proteicas de bajos pesos moleculares, siendo la uteroglobina la más importante, esto como respuesta a estímulos hormonales de progesterona en ambas especies, el momento de la modificación de las secreciones uterinas coincide con la implantación del embrión. En estas secreciones, se encuentra una sustancia (o sustancias) que inhiben la actividad de los leucocitos (3,37).

Kiubar, ha medido la concentración de fagocitos en el estroma uterino de vacas durante los diferentes estadios del ciclo estral usando técnicas histológicas, y ha observado un incremento en los neutrófilos y linfocitos cerca del endometrio durante la fase folicular del animal. Estos aumentos pueden ser explicados debido a que el aparato reproductor de la hembra durante el estro, se encuentra "abierto" hacia células extrañas (espermatozoides) en este período (13,44).

Bedford ha observado que durante el período estral de la coneja la fagocitación de las células espermáticas se ve más acentuada principalmente en aquellas células que han sufrido alguna alteración en el acrosoma, la cual podría ser debido al proceso de su capacitación (4).

En estudios histológicos realizados en la vagina de la coneja, Tayler ha observado una invasión de leucocitos en menos de treinta minutos cuando fue inseminado el animal de manera natural o artificial sin embargo, esta reacción leucocitaria no se presenta cuando la inseminación se practicó con una muestra libre de plasma seminal o con un macho vasectomizado (40).

Phillips et al, piensan que la invasión de leucocitos en la vagina de la coneja puede ser inducida por diversos factores como lo son por ejemplo el semen, las células espermáticas o una infección bacteriana (33).

Lammings y Haynes, han estudiado la composición química de los fluidos uterinos en la fase luteal de

la vaca, en coneja en pseudogestación y en ratas durante el estro, han observado un incremento en la susceptibilidad hacia las infecciones en este órgano de las especies mencionadas, durante los estadios anteriormente citados. La composición de estos fluidos son básicamente proteínas, uteroglobina y glicoproteínas las más importantes y enzimas, endopeptidasa siendo esta la más importante (18).

Anderson y Alexander, han observado que cuando se induce una invasión de leucocitos al lumen uterino de las ratas, antes o durante la implantación de los embriones, se produce un decremento considerable en la fertilidad de estos animales (1).

III O B J E T I V O S.

Tomando en consideración la importancia que tiene un sangrado durante el momento de la introducción de los embriones en el útero de la hembra receptora, se planteo el siguiente objetivo : valorar la influencia del sangrado en el cuerno uterino, en el momento de la transferencia de embriones y su repercusión sobre el desarrollo fetal.

IV MATERIAL Y METODOS

A) Obtención de Embriones.

Los embriones utilizados son de rata Wistar (2.5 a 3 meses de edad y con un peso de 200 a 250gr), en el estadio de blastocisto, el cual se obtiene en el quinto día de gestación del animal, considerando como día primero el día de detección del tapón vaginal, teniendo en cuenta que su gestación dura 21 días.

Para la obtención de los embriones se procede, de la siguiente manera, por medio de una dislocación cervical se sacrifica al animal, y en su región ventral se realiza la asepsia correspondiente utilizando una solución diluida de benzal (1 : 1000), para posteriormente efectuar en esta región una incisión en forma de "Y" (en sentido postero anterior), con la finalidad de poner al descubierto el aparato reproductor.

Se disecciona el útero y se sumerge en una solución salina esteril. Para la obtención de los embriones en el estadio de blastocisto, se perfunde el órgano en

su región anterior utilizando una aguja del No 27 y pinzas de punta. Aproximadamente se requiere de 1 a 2 ml de medio o de solución salina para lograr perfundir completamente el órgano (lamina fotográfica I).

El líquido de perfusión se colecta en vidrios de reloj para su posterior observación al microscopio. Todos los embriones colectados y clasificados como morfológicamente normales, se lavan en solución Hartmann (ver inciso B), un mínimo de tres ocasiones antes de ser transferidos a las hembras receptoras.

B) Medio de Colecta.

La solución empleada en el presente trabajo, para colectar y transferir los embriones. Es la solución Hartmann (Lab. Abott), la cual fue suplementada con suero de ternera termoinactivado a 56 °C por 30 minutos.

C) Transferencia de Embriones.

La transferencia de los embriones a las ratas receptoras se realizó de la siguiente manera : Las hem-

L A M I N A F O T O G R A F I C A I

- a) *La fotografía muestra un hembra sacrificada con incisión en "V" .*

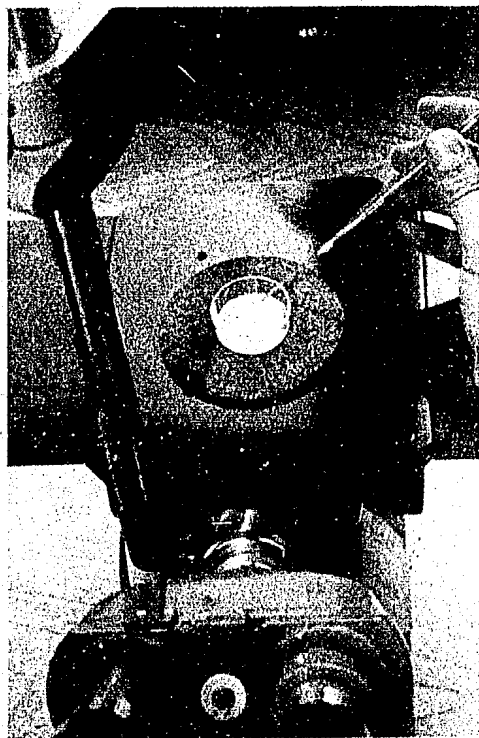
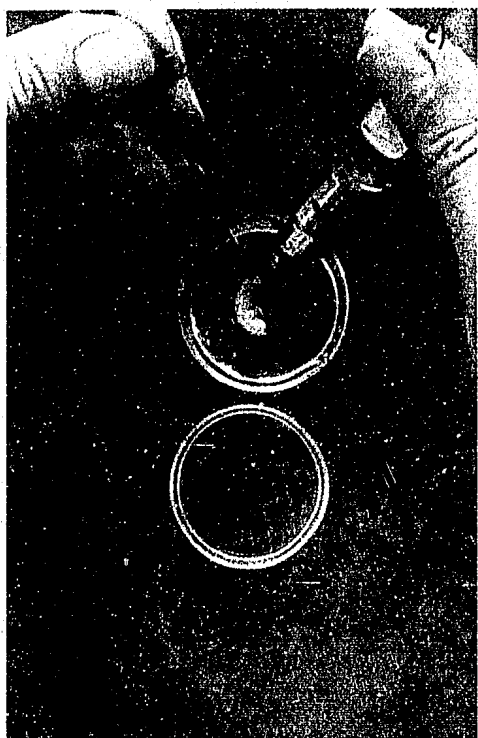
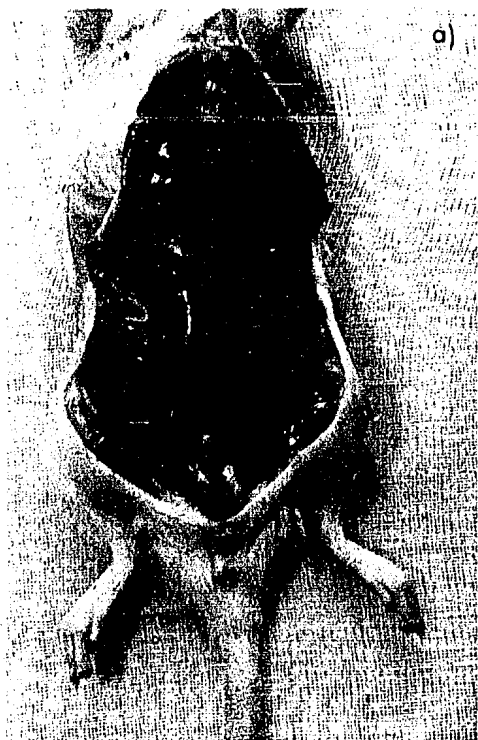
- b) *La fotografía muestra la forma de diseccionar el útero para extirparlo.*

- c) *La fotografía muestra la manera en que se perfunde el órgano para obtener los embriones de su interior.*

- d) *La fotografía muestra la forma para la identificación de los embriones morfológicamente normales con un microscopio invertido para facilitar la manipulación de estos.*

LAMINA FOTOGRAFICA I

FAVELA



bras receptoras seran aquellas que se encuentren en el 5o dia de pseudogestación, lo cual se logra colocan^dolas en jaulas con machos previamente vasectomizados (en una relación de 1 : 1).

Para la transferencia de los embriones, se anes^tesia por medio de inhalaciones de eter a la hembra receptora, en su región ventral medio lateral se efec^tua la depilación correspondiente seguida de una asepsia con una solución diluida de benzal (1 : 1000), el paso siguiente es realizar una pequeña incisión por planos (piel, grasa subcutanea, musculos y peritoneo), para poder exteriorizar su cuerno uterino (lamina fotogr^fica II).

Una vez logrado lo anterior, se punciona el órgaⁿo en su porción craneal, con cuidado, con objeto de evitar un sangrado en esta región ya que es bastante vascularizada. Los embriones (un total de 4) se trans^fieren al interior del lumen uterino, en 1 μ l de solución, utilizando una pipeta de transferencia, cuyo extremo poseé un diámetro de 120 μ m aproximadamente, con el proposito de controlar dicho volumen de trans-

ferencia, ya que si se emplean cantidades mayores los sitios de implantación embrionaria pueden verse afectados (6,28), (lamina fotografica II).

Finalizado el procedimiento, se observa la pipeta de transferencia al microscopio para certificar que los embriones han sido transferidos. Posteriormente, se regresa con precaución el útero hacia la cavidad abdominal y se procede a realizar la sutura por planos, peritoneo y musculos abdominales se suturan en grupo con puntos en "U" y piel con puntos separados posteriormente se agrega desinfectante en la herida.

D) Efecto del Sangrado en el Desarrollo Embrionario.

Para determinar el efecto del sangrado en el desarrollo in vivo de los embriones, se procedió de la siguiente manera: Las receptoras (un total de 20), se dividieron en dos grupos, experimental y control. Al primero de estos se les transfirió 1 μ l de sangre perteneciente al mismo animal, al interior del lumen uterino una vez que se habían transferido los embriones. La sangre se pipetea del músculo abdominal del

L A M I N A F O T O G R A F I C A II

- a) *La fotografía muestra la incisión, ventral medio lateral para exponer el cuerno uterino sin dificultad.*

- b) *La fotografía muestra la parte donde se punciona el útero (región craneal), para facilitar la introducción de la pipeta de transferencia.*

- c) *La fotografía muestra la introducción de la pipeta de transferencia en el cuerno uterino para depositar los embriones.*



animal donde este fue incidido, en caso de que este no sangre se le provoca una pequeña hemorragia cortando el músculo, se pipetea el sangrado y se introduce al lumen uterino inmediatamente. Los animales del grupo control en lugar de recibir 1 μ l de sangre, se les introdujo el mismo volumen pero de medio de transferencia. Las hembras de ambos grupos fueron sacrificadas 15 días después de la transferencia, con la finalidad de observar el porcentaje del desarrollo fetal.

E) Efecto del Sangrado en la Viabilidad Embrionaria.

Para poder determinar la relación entre los embriones transferidos y las células sanguíneas, se procedió de la misma manera que en el inciso anterior, tanto en el grupo experimental (un total de 3) como en el grupo control (un total de 3), sin embargo los embriones se recuperaron nuevamente después de 10 horas de haber sido transferidos y se procedió a realizar un registro fotográfico.

F) Registro Fotográfico de los Embriones Transferidos.

El análisis fotográfico de los embriones transfe

*ridos con y sin sangre se realizó utilizando un mi---
croscópio invertido y uno de contraste de feses, am--
bos con camara integrada.*

*La película utilizada fue ; Panatomic-X, 32 asa,
kodak, para impresiones en blanco y negro.*

Y RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se ilustran en las tablas 1 y 2, así como en la lamina fotográfica, y se analizarón de la siguiente manera :

A) Desarrollos Fetales.

Las transferencias embrionarias que se llevarón a cabo con sangrado, produjerón una notable disminución en el desarrollo fetal (53.6% menos), en comparación con aquellas en que este se evitó, así mismo el promedio de implantación por cuerno uterino mostró la misma tendencia ya que de cuatro embriones transferidos, se desarrollaron en promedio 2.6 fetos en las transferencias hemorrágicas y 3 fetos en las transferencias no hemorrágicas (ver tabla 1).

Por último solo el 55% de los cuernos uterinos (considerados de manera individual) quedarón gravidos debido a la influencia del sangrado en comparación del 90% que se logró en el grupo control, además se recurrió a un analisis estadístico (CHI-CUADRADA),

encontrándose diferencias significativas (ver tabla 1).

Los resultados anteriores podrían ser explicados de la siguiente manera, los embriones en período de preimplantación poseen una membrana que los rodea, llamada zona pélcida, la cual desempeña numerosas funciones dentro de las cuales cabe destacar :

- 1) Permite la capacitación de los blastómeros que con forman el embrión (16).
- 2) Proteje al embrión junto con el espacio periviteli no de posibles traumatismos durante el descenso por el oviducto (6, 29).
- 3) Impide que el embrión se implante en regiones ex- trauterinas (31).
- 4) Evita el ingreso de leucocitos al interior del em brión (20, 30, 31).

Es precisamente esta última función la que va a ser de gran importancia para el embrión durante una

T A B L A I

Influencia del sangrado durante la transferencia de embriones en el porcentaje del desarrollo fetal.

	TRANSFERENCIAS			
	CON SANGRE		SIN SANGRE	
	No	%	No	%
<i>Hembras receptoras.</i>	10		10	
<i>Embriones totales transferidos.</i>	80	100	80	100
<i>Desarrollos fetales totales.</i>	29 (a)	36.2	54(b)	67.5
<i>Embriones transferidos por cuerno.</i>	4	100	4	100
<i>Promedio de desarrollos fetales por cuerno.</i>	2.6	65	3	75
<i>Número de cuernos uterinos gravidos.</i>	11 (a)	55	18(b)	90

Letras diferentes (a) y (b), en los renglones representan diferencias significativas ($P < 0.05$) chi-cuadrada.

transferencia en que se ha producido un sangrado hacia el interior del lumen uterino en el momento de puncionar el órgano debido a que la zona pélucida va a impedir de primera instancia que los leucocitos que migren a la región que ha sido alterada por los mismos, procedentes del sangrado fagociten al embrión, lo anterior coincide con lo observado por Anderson y Alexander (1).

Sin embargo si la invasión de células blancas ha sido considerable y permanecen en el lumen uterino, estas van a digerir al embrión en el momento en que salga de su zona pélucida para transformarse en un blastocisto elongado, o inicie tal proceso mediante una fractura de su membrana ya que en ese instante los leucocitos van a poder ingresar hacia su interior. Lo anterior se encuentra ilustrado en la lamina fotográfica en donde se muestran los embriones (blastocistos) recuperados después de 10 horas en que fueron transferidos con sangre al interior de la hembra receptora. Así observamos blastocistos que poseen leucocitos adosados a su zona pélucida y uno que fue fagocitado por este tipo de células después de que entra-

rón a su interior a través de una fractura de dicha membrana (lamina fotográfica III).

B) Alteraciones Uterinas.

Se observaron principalmente dos tipos de alteraciones uterinas después de que las transferencias embrionarias hemorrágicas se evaluaron: Infecciones uterinas y reacciones deciduales (ver tabla II).

1) Infecciones Uterinas.

La presencia de infecciones uterinas en las hembras a las que se les efectuó la transferencia embrionaria hemorrágica, fue del 40% a comparación del 0% observado en las transferencias del grupo control.

Así mismo en todos los casos de infección, los cuernos uterinos afectados no presentaban ningún desarrollo fetal por lo que esta alteración se considera como un factor de suma importancia en la disminución de la fertilidad de una hembra, esto último ha sido observado de igual manera por Anderson y Alexander (1).

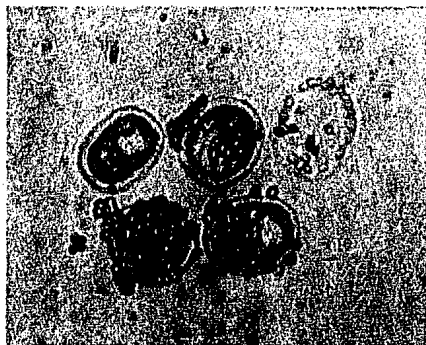
L A M I N A F O T O G R A F I C A I I I

- a) En la fotografía se observan embriones (5) con leucocitos adosados a la superficie de la zona pélucida, la resolución en el microscópio es de 40X.
- b), c), y d) Fotografías aisladas que muestran el adosamiento más detallado, de los leucocitos en las zonas pélucidas, por tener un mayor aumento en el microscópio 200X.
- e) La fotografía corresponde a una zona pélucida vacía, que contiene en su interior leucocitos los cuales fagocitarón al embrión después de haber ingresado a través de una fractura en esta membrana, la resolución en el microscópio es de 200X.

LAMINA FOTOGRAFICA III

LEUCOCITOS ADHERIDOS A LA SUPERFICIE DE LOS EMBRIONES

a) FAVELA



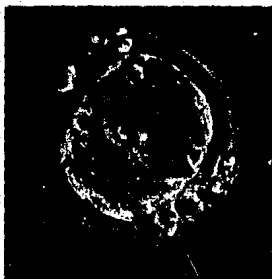
b)



c)



d)



e)



50 μ M

T A B L A II

Influencia del sangrado durante la transferencia de embriones en producir alteraciones uterinas.

	TRANSFERENCIAS			
	CON SANGRE		SIN SANGRE	
	No	%	No	%
<i>Hembras receptoras.</i>	10	100	10	100
<i>Hembras con infección uterina.</i>	4	40	0	0
<i>a) Hembras con infección en ambos cuernos.</i>	1	10	0	0
<i>b) Cuernos uterinos con infección y desarrollo fetal.</i>	0	0	0	0
<i>Hembras con reacción decidual uterina.</i>	7	70	1	1
<i>a) Hembras con reacción decidual en ambos cuernos.</i>	0	0	0	0
<i>b) Cuernos uterinos con reacción decidual y desarrollo fetal.</i>	2	10	0	0

La probable explicación al alto porcentaje de infección uterina encontrado, sería debido posiblemente a la disminución de las defensas biológicas (células) del animal, como resultado a estímulos hormonales (progesterona) los cuales van a coincidir con el momento de la implantación y transferencia del embrión (42). Además, la sangre que ingresa al interior del cuerno uterino durante la transferencia sirve como vehículo a elementos celulares contaminantes (bacterias), que elevan la probabilidad de una infección.

2) Reacciones Deciduales.

La reacción decidual es la modificación de la mucosa uterina (endometrio) inducida por el embrión en el sitio de implantación (42).

Sin embargo, Finn ha observado que las reacciones deciduales no solo las puede causar el embrión sino que también un traumatismo mecánico y/o una estimulación interna, que se presente en el momento de la implantación (12).

Se ha encontrado que las reacciones deciduales son mucho más frecuentes (ver tabla II), en las transferencias con sangrado, lo cual podría deberse a la presencia de inductores en la sangre sin embargo, estas reacciones no impiden el desarrollo fetal en los sitios vecinos, por lo que se podría considerar, que el desarrollo de una reacción decidual va a traer como consecuencia la eliminación de un sitio de implantación embrionaria y por consiguiente la disminución en el porcentaje de preñez.

De la misma manera en un trabajo realizado por Bronson et al (6) y McLaren et al (28), observaron que los medios que se emplean para transferir a los embriones no afecta la viabilidad de estos sin embargo, si se emplean en volúmenes excesivos esto puede traer como consecuencia el desplazamiento de los embriones a lo largo del cuerno uterino provocando una distribución anormal de estos, o a la obstrucción de los sitios de implantación, reduciendo por lo tanto su número, por lo que en ambos casos se disminuye el nivel reproductivo del animal.

VI CONCLUSIONES

Tomando en consideración los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir :

- a) El sangrado producido durante una transferencia de embriones puede disminuir considerablemente el desarrollo fetal, debido a que los leucocitos transferidos tienen la posibilidad y la capacidad de fagocitar a los embriones.
- b) El sangrado producido durante una transferencia de embriones puede incrementar la posibilidad de infección y/o el desarrollo de reacciones deciduales uterinas por lo que la fertilidad del animal se vera disminuida, debido a que los embriones no encuentran sus sitios de implantación .

Recomendaciones.

- 1) Durante la transferencia de embriones se recomienda punccionar el cuerno uterino en una región poco vascularizada con el fin de evitar un sangrado interno que pueda alterar la viabilidad de los embriones.

2) Durante el proceso de la transferencia de embriones se recomienda manipular lo menos posible el cuerno uterino, con el propósito de evitar posibles traumatismos que puedan modificar los sitios de implantación embrionaria.

3) Se recomienda trabajar bajo las máximas condiciones de asepsia durante la transferencia de embriones ya que de lo contrario se eleva la posibilidad de una infección uterina, la cual alteraría el nivel reproductivo de la hembra.

Tomando en consideración las similitudes tanto estructurales como fisiológicas de las células sanguíneas entre las diferentes especies de mamíferos, se podrían extrapolar en términos generales los resultados obtenidos en el presente trabajo, a los animales domésticos de importancia económica, en donde se efectuen los procedimientos de transferencia de embriones.

VII B I B L I O G R A F I A

1. Anderson, D. and Alexander, N. : Induction of uterine leukocytosis is and its effect on pregnant rats. *Bio. Rep.* 21: 1143-1152 (1979).
2. Asbury, A.C. : Uterine defense mechanisms in the mare. *Theriogenology.* 21: 388-393 (1984).
3. Arthur, A.T. and Daniel, J.C. : Progesterone regulation of blastokinini production and maintenance of rabbit blastocysts transfer into uteri of castrate recipients. *Fertil. Steril.* 23: 115 (1972).
4. Bedford, J.M. : Effect of enviroment of phagocytosis of rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 9: 249-256 (1965).
5. Betteridge, K.J. : Embryo transfer in farm animals. *Canada Departament of Agricultur.* 16: 34-41 (1977).

6. Bronson, R.A. and McLaren, Anne. : Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 22: 129-137 (1970).
7. Chang, M.C. : My work on the trasplantation of mammalian eggs. *Theriogenology.* 19: 293-303 (1983).
8. Chang, M.C. : Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature.* 159: 602-603 (1947).
9. Daniel, J.C. : Cleavage of mammalian ova inhibited by visible light. *Nature.* 201: 316-317 (1964).
10. David, J.S.E., Jones, W.A., Newcomb, R., Smith, G.F. and Wishart, D.F. : Embryo transfer with a particular reference to cattle. *The riogenology.* 11: 300-309 (1977).
11. Dickmman, Z. and et al. : The fate of the ova

transferred into uterus of the rat. *J. Reprod. Fert.* 1: 197-212 (1960).

12. Finn, C.A. : Osetrogen and the decidual cell reaction of implantation in mice. *J. Endocri.* 32: 223-229 (1965).
13. Frank, T., Anderson, K.L., Smith, R.R., and Gustafsson, B.K. : Phagocytosis in the uterus. *Theriogenology.* 20: 103-110 (1983).
14. Ganong, William.E. : *Manual de Fisiología Médica.* 3a edición. ed. El manual moderno. Mexico Cap. 4: 98-122 (1971).
15. Guyton, Arthur.C. : *Tratado de Fisiología Médica* 3a edición. ed. Interamericana. Mexico. Cap. 8: 111-124, 9: 125-134 (1972).
16. Hafez, E.S.E. : *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals.* Lea & Febiger. Philadelphia. Cap. 7: 137-156 (1970).

17. Hafez, E.S.E. : *Reproduction in farm animals*. 4 th. Lea & Febiger. Philadelphia. Cap. 6: 444-451 (1980).
18. Hawk, T. : *The bactericidal properties of uteri and uterine exudates of rabbits with reduced leukocytic activity*. *Am. J. Vet. Res.* 21: 1318-1321 (1960).
19. Houck, J. and Chang, C. : *The chemotactic properties of the products of collagenolysis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 69-74 (1968).
20. Hunter, R.H.F. : *Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos*. 1a edición. ed. Acribia. España. Cap. 11: 203-217 (1982).
21. Hughes, J.P. and Loy, R.C. : *Investigation the effect of intrauterine inoculation of Streptococcus zooepidemicus in the mare*. *Equine Pract.* 15: 289-292 (1968).

22. Jillela, D. : *Embryo transfer technology and its applications in developing countries. Food and Agricultural Organization of the United Nations. (FAO) (1981).*
23. Junqueira, L.C. y Carneiro, J. : *Histologia Basica. Ia edición. ed. Salvat. Barcelona. Cap. 13: 221-233 (1974).*
24. Krueger, W. and Sain, L. : *Effect of direct injection of neutrophils from uterine leukocytosis and its effect on pregnant rats. Fert. Steril. 27: 1318-1321 (1976).*
25. Lamond, D.R. and Urghart, E.J. : *Sheep laparotomy cradle. Australian Vet. J. 37: 430-431 (1961).*
26. Leeson and Leeson. *Histologia. 2a edición. ed. Interamericana. Mexico. Cap. 8: 123-138 (1970).*
27. Mc Donald, L.E. : *Veterinary Endocrinology and Reproduction. 3 th Les & Febiger. Philadelphia (1980).*

28. McLaren, Anne. and Donald, Michie. : Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. *J. Exp. Biol.* 33: 294-316 (1956).
29. McLaren, A. : The fate of the zona pellucida in mice. *J. Reprod. Fert.* 62: 199-203 (1981).
30. Moore, N.W., Adams, C.E. and Rowson, L.E.A. : Developmental potential of single blastomeres of the rabbit eggs. *J. Reprod. Fert.* 17: 527-531 (1968).
31. Modlinski, A. : The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *J. Embriol. Exp. Morph.* 23: 539-547 (1970).
32. Murray, F. : Uterine fluids and implantation. IX Congreso Internacional de Reproducción Animal. 2: 217-227 (1980).
33. Phillips, D.M. : Leukocyte emigration and migration in the vagina following mating in the rabbit. *Anat. Rec.* 189: 45-51 (1977).

34. Rowson, L.A.E., Moore, R.M. and Fry, G.E. : The relationship between ovarium hormones and uterine infections. *Vet. Rec.* 65: 335-341 (1983).
35. Schulten, L.R. and Ward, P. : Neutrophils and mechanisms of IUD action in rats. *Fert. Steril.* 26: 131-136 (1983).
36. Shea, L.W. : Evaluating the bovine embryos. *Theriogenology.* 15: 31-46 (1975).
37. Squire, G.D., Bazer, F.W. and Murray, F. : Electrophoretic patterns of porcine protein secretions during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 7: 321-328 (1972).
38. Sreenan, J.M., Diskin, M.G. and Donagh, T. : Egg transfer in the cow effect of site of transfer. *Vet. Rec.* 94: 340-345 (1974).
39. Sreenan, J.M. : Successful non surgical transfer of fertilized cow eggs. *Vet. Rec.* 96: 490-491 (1975).

40. Tayler, K.R. : *Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus. J. Reprod. Fert.* 49: 341-351 (1977).
41. Tizard, I.R. : *Inmunologia Veterinaria. Ia edición. ed. Interamericana. México. Cap. 2: 10-24 , 7: 104-117 (1979).*
42. Walter, J.B. : *Effect of direct injection of neutrophils from uterine horns of rats containing intrauterine devices into recipient pregnant uterü. Fert. and Ster.* 27: 1356-1359 (1976).
43. Wright, J.M. : *Non-surgical embryo transfer in cattle embryo recipient interaction. Thetiology.* 15: 43-56 (1981).
44. Washburn, S.M. : *Effect of ovarian hormones on the phagocytic response of ovariectomized mares. Am. J. Vet. Rec.* 43: 1367-1370 (1982).
45. Zigmond, S.H. and Hirsch, J.G. : *Leukocyte locomotion and chemostatic. J. Exp. Med.* 137: 387 (1973).