

7

203



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

**Suplementos Nutritivos para el Cultivo
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 :

Jesús Alejandro Arreguín Arévalo



**Directores: Biol. J. Raúl Astiazarán Ybarra
M.V.Z. Arturo Trejo González**

V N A M

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1986



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.

INDICE

Contenido	Página
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	3
A.- Generalidades del Cultivo Embrionario	3
B.- Características del Desarrollo Embrionario	6
C.- Transporte Embrionario	10
D.- Formación del Blastocisto	12
E.- Cultivo Embrionario	13
III.- OBJETIVOS	17
IV.- MATERIAL Y METODOS	18
A.- Obtención de Embriones	18
B.- Medio de Colecta de Embriones	21
C.- Medios de Cultivo	21
D.- Sistemas de Cultivo	22
E.- Desarrollo Embrionario	24
V.- RESULTADOS Y DISCUSION	26
VI.- CONCLUSIONES	36
VII.- BIBLIOGRAFIA	38

1.- RESUMEN

El cultivo en el laboratorio de las últimas etapas de la preimplantación embrionaria es indispensable para los estudios de su manipulación y transferencia.

Con este objetivo se probaron diversos suplementos nutritivos para poder determinar cuales permiten el desarrollo in vitro de los embriones de rata Wistar. La solución salina con base en Earle fué la que se utilizó para ser enriquecida con los diferentes suplementos nutritivos: suero de rata (SR), suero de rata preñada (SRP), suero de ternera (ST), suero fetal de ternera (SFT), albúmina sérica bovina (ASB), suero humano (SH), clara y yema de huevo (H) y agar (A).

Fueron cultivados un total de cincuenta embriones en la etapa de ocho células en cada uno de los suplementos nutritivos probados. Los embriones se obtuvieron perfundiendo el oviducto del animal en el cuarto día de preñez. Después de un lapso de 24 horas de cultivo a 37°C los embriones se desarrollaron sólo en los siguientes medios: SR, 64 %; SRP, 82 %; ST, 52 %; SFT, 54 %; ASB, 28 %; y SH 74 %.

De los resultados anteriores se observa que la uti
lización de un suero homólogo favorece el desarrollo de
los embriones fuera de su ambiente materno.

II.- INTRODUCCION

A.- Generalidades del Cultivo Embrionario.

Alrededor de los últimos cincuenta años se han logrado grandes avances en el cultivo de embriones en el laboratorio, gracias a los conocimientos establecidos en las técnicas de desarrollo de tejidos, sin embargo no se han obtenido grandes logros en el cultivo y desarrollo in vitro de los embriones de muchas especies de mamíferos, ya que los embriones son mucho más sensibles a las variaciones del medio que cualquier otro tipo de líneas celulares (25).

El primer medio de cultivo elaborado para el desarrollo in vitro de embriones de mamíferos fue diseñado por Whitten (26) en 1956, y con el cual se pudo lograr el crecimiento de embriones de ocho células de ratón. Posteriormente Mc. Laren y Biggers (18) utilizando los embriones desarrollados con el medio anterior los transfirieron a hembras receptoras logrando el crecimiento de crías normales.

Un medio de cultivo para embriones debe de contar con los requerimientos energéticos y protéicos que le

permiten su desarrollo fuera del ambiente materno. El cultivo de embriones de ratón se ha empleado como modelo para estudiar las actividades y necesidades metabólicas de los embriones en sus estadios de preimplantación (14), y sobre la base de estos trabajos se identificaron las necesidades de piruvato, lactato y algunas fuentes de nitrógeno indispensables que deben llevar los medios de cultivo.

Los medios de cultivo para embriones en desarrollo deben reunir los componentes mínimos necesarios de los fluidos tubéricos y uterino durante el período de preimplantación, como lo son, las sales y los nutrientes protéicos y energéticos y factores físicos como temperatura, pH y presión osmótica.

Hemond logró desarrollar embriones de ratón de la etapa de ocho células hasta la de blastocisto, empleando como medio de cultivo una combinación de clara y yema de huevo con sales inorgánicas (10).

Dentro de las diversas áreas de la Embriología experimental que requieren del cultivo de embriones fuera del ambiente materno se encuentran las siguientes:

- a) Fecundación in vitro. Este procedimiento sólo es posible cuando se conocen las necesidades metabólicas de ambas células gaméticas.
- b) Almacenaje de embriones a bajas temperaturas. Con las técnicas de refrigeración y congelación de embriones es posible preservar a éstos por diferentes lapsos de tiempo, sin que su viabilidad se vea disminuida sin embargo es indispensable contar con un medio de cultivo adecuado que permita a los embriones restablecerse antes de que sean transferidos.
- c) Microcirugía embrionaria. Los procesos tanto de gemelación como de quimerización embrionarios han sido posibles cuando se ha contado con medios de cultivo apropiados para que los embriones puedan recuperarse de su cirugía.
- d) Transferencia de embriones. Durante los programas de transferencia es frecuente obtener embriones que no se encuentran en el estadio apropiado para ser transplantados, sin embargo si a éstos se les coloca en un medio de cultivo adecuado es posible que alcancen dicha etapa para poder ser aprovechados.

e) Metabolismo embrionario. Dentro de las áreas de investigación se emplean los medios de cultivo de embriones como una herramienta para conocer sus requerimientos para su desarrollo en el laboratorio.

B.- Características del Desarrollo Embrionario.

Las células germinales, tanto de los machos como de las hembras descienden de manera mitótica de un grupo muy reducido de células que se originan cerca del saco vitelino embrionario. En el macho estas divisiones mitóticas continúan a lo largo de la vida adulta, sin embargo, en las hembras estas divisiones cesan en las células llamadas ovogonias durante el desarrollo embrionario, por lo que los ovocitos entran en una prolongada profase meiótica (11).

Momentos antes de la ovulación, se lleva a cabo la primera división de maduración del ovocito primario, para transformarse en un ovocito secundario y liberar un corpúsculo polar. La segunda división de maduración comienza inmediatamente y el ovocito permanece en metafase hasta el momento de su fertilización. Aproximadamente se liberan de ocho a catorce óvulos simultáneamente en la

rata bajo condiciones naturales, sin embargo, esto va a depender del tipo y variedad de la especie que se trate (11).

Si la monta de la hembra se lleva a cabo, ésta generalmente precede a la ovulación por una a cinco horas. La ovulación por sí misma es rápida y toma menos de una hora en efectuarse. La fecundación del óvulo se lleva a cabo en la parte superior del oviducto cuando la monta y la ovulación se presentan dentro de un lapso muy breve (14).

Se ha observado que los espermatozoides inician la fertilización de los ovocitos después de dos a tres horas de efectuada la cópula, y se requiere de un lapso de cuatro horas más para que todos los óvulos queden fecundados. El retraso de la monta hacia el final del ciclo estral puede tener como consecuencia anormalidades en el núcleo del embrión ó la polispermia (2).

El ovocito secundario se encuentra rodeado por células foliculares (corona radiada y cúmulus ophurus), y posee un diámetro aproximado de 72 micrómetros; sin tomar en consideración las envolturas celulares. Su cito-

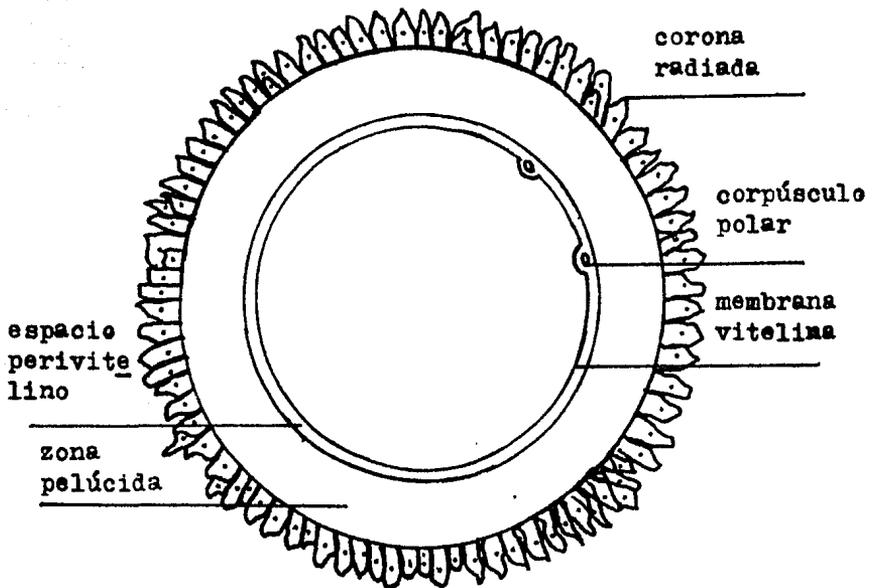
-plasma es de apariencia translúcida y granular, sin embargo, dicha apariencia puede modificarse dependiendo de la variedad de animal de que se trate (19).

El embrión se encuentra rodeado por una membrana elástica llamada zona pelúcida, de aproximadamente once micrómetros de grosor. Esta membrana se encuentra separada del embrión por medio de un espacio llamado perivitelino (Figura 1).

En el momento de la fecundación, el ovocito libera su segundo corpúsculo polar y los pronúcleos tanto masculino como femenino comienzan a organizarse en el centro de su citoplasma (11,12).

Las células de la corona radiada y del cúmulus ophurus son dispersadas de la superficie del embrión por la acción de las enzimas acrosomales de los espermatozoides y esto se lleva a cabo antes de que el estadio de dos células se alcance. Se requieren aproximadamente doce horas para que se presente la primera división llamada de segmentación en el ovocito recién fertilizado (19).

Figura 1.- Representación esquemática de un ovocito de rata (11).



Las divisiones de segmentación embrionarias, son divisiones mitóticas, las cuales, además de ser relativamente lentas dan como resultado células de menor tamaño progresivamente (6).

Las células o blastómeros que conforman a los estadios embrionarios de dos células, cuatro células, ocho células, mórula y blastocisto son progresivamente más pequeñas, sin embargo, el diámetro embrionario es prácticamente el mismo, siendo el blastocisto ligeramente más grande que el ovocito (23).

C.- Transporte Embrionario.

Actualmente se sabe que tanto el ovocito como los embriones se mueven a lo largo del oviducto a diferentes ritmos, así, por ejemplo tanto en el ratón como en la rata los ovocitos se trasladan en pocos minutos a través del primer pliego del útero, para alcanzar posteriormente su porción dilatada en donde permanecerán por varias horas. En muchas especies la zona entre el istmo y el útero tubárico funciona como un esfínter fisiológico ya que en esta región los embriones son retenidos por largos períodos (14).

Aunque la unión útero-tubárica puede actuar restringiendo el transporte embrionario, rara vez es posible localizar a dichos embriones en esta región, lo cual indica que el transporte a través de esta zona debe ser rápido.

En animales como el ratón donde el transporte embrionario es rápido el estadio de mórula tardía ó blastocisto temprano alcanza la región uterina en la mañana del tercer día de preñez, sin embargo, en el caso de la rata tal proceso lleva un día más (9).

Los embriones en el interior del oviducto son transportados por medio de movimientos peristálticos del utero y tanto la zona pelúcida como el espacio perivitellino del embrión "amortíguan los golpes" que éste recibe a lo largo del trayecto. Además la zona pelúcida juega un papel muy importante evitando que el embrión se adhiera a las paredes del oviducto y que sus blastómeros se dispersen durante la segmentación (7).

D.- Formación del Blastocisto.

Cuando la segmentación da comienzo, existe un espacio pequeño entre la zona pelúcida y el embrión, la cual se denomina espacio perivitelino, (Figura 1). Durante las primeras divisiones cualquier espacio que desarrolle entre los blastómeros pasa al espacio anterior. Cuando una pequeña abertura comienza a delimitarse en el interior del embrión se considera que la formación de la etapa de blastocisto se ha iniciado (6).

La delimitación de la cavidad ó espacio en el interior del embrión se denomina blastocele y ésta va acompañada de la formación de enlaces intercelulares, lo que trae como consecuencia un aumento en la compactación celular.

Con la formación del blastocisto se presenta el primer signo de diferenciación celular en el embrión, distinguiéndose de esta manera dos tipos celulares diferentes: las células de la masa celular interna ó botón embrionario y las células del trofoblasto. Las primeras darán origen al endodermo, ectodermo y mesodermo embrionarios, y las segundas al cono ectoplacentario, ectodermo

extraplacentario (corion), y las formas tanto primarias como secundarias de las células trofoblasticas gigantes (12).

E.- Cultivo Embrionario.

Como ya se mencionó anteriormente, un medio de cultivo para embriones de mamíferos debe de contar con los requerimientos iónicos, energéticos y protéicos que permitan el desarrollo de éstos fuera del ambiente materno (4,5).

A lo largo del tiempo, los medios de cultivo que se han utilizado para los embriones de diferentes especies como por ejemplo de conejo, ratón, rata y hamster han sido diversos; teniendo de esta manera los medios; BMOC-3; medios Whittingham; HAM-F10; TC-199; medio de Eagle, etc (14).

Los medios anteriores poseen una composición salina muy semejante entre sí, por lo que han sido utilizados casi de manera indistinta para el cultivo de embriones de diferentes especies.

De los resultados obtenidos en el desarrollo embrionario de diferentes especies de animales domésticos se han establecido los requerimientos energéticos y proteícos que éstos necesitan para su estancia fuera del ambiente materno (4,5).

Dentro de los requerimientos energéticos se encuentran el piruvato de sodio y lactato de sodio, los cuales son indispensables para el metabolismo del embrión en los estadios de una a cuatro células.

Tanto la glucosa como el oxalacetato han sido identificados de igual manera como fuentes energéticas importantes, siendo la primera indispensable para el crecimiento y eclosión del estadio de blastocisto (15).

Los requerimientos proteícos más comunmente utilizados para el cultivo en el laboratorio de embriones son la albúmina sérica bovina y el suero fetal de ternera termo-inactivada. El suero es una mezcla compleja de muchos compuestos, los cuales se encuentran aún pobremente caracterizados, además las concentraciones de algunos de sus componentes varían enormemente entre las diversas fracciones del mismo suero (3,16).

La albúmina sérica denominada también albúmina plasmática, es la proteína de mayor abundancia presente en el suero; dentro de sus principales funciones se encuentran las de contribuir a la homeostasis, servir de fuente de aminoácidos para las células y ser acarreador de hormonas y ácidos grasos (21).

Una de las principales funciones del suero es la de proveer cierto tipo de hormonas, así como sitios protéicos de unión, los cuales reconocen tanto a vitaminas, lípidos y algunas hormonas. Estos sitios pueden estabilizar y modular la acción de ciertas sustancias a las cuales se unen, y en algunos casos pueden además actuar desintoxicando el medio captando iones metálicos (3).

El suero es indispensable para el crecimiento de los embriones del estadio de blástula primaria al de blastocisto expandido. De hecho Konwinski (17) comenta que el suero fetal de bovino es necesario para la diferenciación de la masa celular interna del embrión.

Sin embargo no ha sido posible obtener el crecimiento y diferenciación del embrión bajo ningún medio después de 72 horas de cultivo, debido a que se presenta

el momento de la implantación de éste en la mucosa uterina (20).

Los estudios que sobre el cultivo de embriones de animales de laboratorio se han desarrollado, han servido de base para el establecimiento de las técnicas de cultivo in vitro de embriones de animales domésticos.

Así tenemos, que tanto los medios de cultivo, fuentes de energía y de proteína se emplean no solamente para el cultivo de embriones de animales de laboratorio, sino también para los animales domésticos (4,5,13,22,27, 28).

III.- OBJETIVOS

La elaboración de este trabajo tiene como objetivo la valoración de diferentes fuentes protéicas en el cultivo in vitro de embriones de rata en el estadio de ocho células, con la finalidad de observar si estas fuentes podrían servir como suplementos protéicos para los medios de cultivo de embriones de especies domésticas.

Las fuentes nutritivas que se estudiaron son:

a) suero de rata, b) suero de rata preñada, c) suero de ternera, d) suero fetal de ternera, e) albúmina sérica bovina, f) suero humano, g) clara y yema de huevo y h) agar.

IV.- MATERIAL Y METODOS

A.- Obtención de Embriones.

Los embriones utilizados son de rata Wistar, y el estadio embrionario que se probó con los diversos suplementos nutricionales fué el de ocho células, el cual se obtiene en el cuarto día de preñez del animal, considerando como día uno, el día de la detección del tapón vaginal (Tabla 1).

Para la obtención de los embriones se procedió de la siguiente manera. Se sacrificó el animal por medio de la dislocación cervical. Su región ventral se esterilizó empleando una solución diluida de benzal, para posteriormente efectuar una incisión en forma de "V" (postero-anterior en relación al vértice de la "V"), con la finalidad de poner al descubierto completamente el aparato reproductor.

Se disecó el oviducto junto con una pequeña porción de útero y se sumergió en una solución salina estéril. Para la obtención de los embriones en el estadio de ocho células, se perfundió el oviducto en su región

fímbrica utilizando una aguja del número 27 y pinzas de relojero.

Aproximadamente se requiere de uno a dos mililitros de medio ó de solución salina para lograr perfundir completamente el órgano. El líquido de perfusión se colocó en un vidrio de reloj para la posterior observación de los embriones al microscopio.

Todos los embriones colectados y clasificados como morfológicamente normales (tabla 2), se lavan por lo menos una vez en medio fresco (PBS) antes de ser transferidos al medio de cultivo, con la finalidad de eliminar los detritus celulares que los acompañan.

La operación de colecta y traslado de embriones se realizó con una pipeta Pasteur, cuya punta posee un diámetro aproximado de 150 micrómetros, con la finalidad de colectar el mínimo medio posible junto con los embriones cuando estos son transferidos.

Tabla 1.- Cronología del desarrollo embrionario en las etapas de preimplantación de la rata.

Día de preñez (°)	Estadíos Embrionarios
UNO	AM..... óvulos recién fecundados
	PM..... una célula +++
DOS	AM..... dos células +++
	PM..... cuatro células +
TRES	AM..... cuatro células +++
	PM..... cuatro células +++
CUATRO	AM..... cuatro células +
	PM..... ocho células +++
CINCO	AM..... mórulas +
	PM..... blastocisto +++
SEIS	AM..... blastocistos elongados +++
	PM..... _____

(°) Se considera como día uno de preñez el día de la detección del tapón vaginal. Bajo condiciones de monta controlada.

Frecuencia de obtención del estadio embrionario:

Mayor (+++) Menor (+)

B.- Medio de Colecta de Embriones.

El medio utilizado para perfundir el oviducto del animal y coleccionar los embriones fue la solución fosfata de Dulbecco (PBS), de laboratorios Difco, suplementada con 1 gr/lt de glucosa, 0.028 gr/lt de piruvato de sodio, 100 UI de penicilina G sódica y 20 % de suero de rata termoinactivada. En este medio los embriones permanecen 10 minutos aproximadamente mientras son colocados en los sistemas de cultivo.

C.- Medios de Cultivo.

La solución salina con base en Earle modificada se utilizó como medio de cultivo de embriones después de haber sido suplementada con los diversos suplementos nutritivos.

Esta solución fue enriquecida con glucosa 1 gr/lt, bicarbonato de sodio 0.35 gr/lt, piruvato de sodio 0.028 gr/lt y penicilina 100 UI.

Además fue suplementada con 20 por ciento de las fuentes nutritivas de manera individual. Siendo éstas:

a) suero de ternera, b) suero de rata preñada, c) suero de ternera, d) suero fetal de ternera, e) albúmina sérica bovina, f) suero humano, g) clara y yema de huevo y h) agar.

Todos los suplementos séricos arriba mencionados fueron inactivados a 56°C por 30 minutos.

Todos los embriones antes de ser cultivados son lavados con el medio en el que permanecerán, con la finalidad de eliminar los restos salinos y protéicos del medio de colecta. La transferencia de los embriones a los medios de cultivo se realiza con la ayuda de una micropipeta cuyo diámetro es de 150 micrómetros aproximadamente y se emplea un volumen de 5 microlitros.

D.- Sistemas de Cultivo.

Con la finalidad de obtener una uniformidad en las observaciones del desarrollo embrionario, los embriones siempre fueron colectados a las 17 horas del cuarto día de preñez.

El sistema de cultivo empleado fué el de la micro-

Tabla 2.- Características morfológicas tomadas en cuenta para la clasificación de los embriones (8,24).

- 1.- Regularidad embrionaria
 - 2.- Tamaño del embrión
 - 3.- Esfericidad del embrión
 - 4.- Espesor y fisuras de la zona pelúcida
 - 5.- Tamaño del espacio perivitelino
 - 6.- Presencia de restos celulares en el espacio perivitelino
 - 7.- Integridad morfológica de los blastómeros
 - 8.- Opacidad citoplasmática de los blastómeros
 - 9.- Número de blastómeros no integrados
 - 10.- Grado de compactación de los blastómeros
-

-gota, el cual ha sido descrito por Brinster (4,5) en 1965, y que consiste básicamente en colocar pequeñas gotas de medio de cultivo (de 0.05 a 0.10 mililitros) sobre una caja de Petri de vidrio, previamente siliconizada, y cubiertas con aceite de parafina líquida.

El cultivo de los embriones se realizó a 37°C en una estufa a temperatura controlada, por un lapso de 24 horas.

E.- Desarrollo Embrionario.

En cada tratamiento se colocaron diez embriones morfológicamente buenos, seleccionados al azar, del conjunto colectado de ocho hembras; repitiendo cada evento cinco veces. La observación del desarrollo embrionario se efectuó al día siguiente al que fueron cultivados.

Al considerar los estudios realizados anteriormente en el laboratorio, se ha visto que los embriones de rata de ocho células, cultivados in vitro, una vez que han alcanzado la etapa de blastocisto si no son transferidos al lumen uterino de una hembra receptora, sufren una

contracción, lo que hace que sean fácilmente confundibles con el estadio de mórula. Esta similitud no indica la falta de desarrollo embrionario, sino mas bien la adquisición de una morfología semejante debida a una colapeación.

Sin embargo, con base en las observaciones constantes llevadas a cabo durante el presente trabajo fue posible discernir entre una mórula y un blastocisto contraido, estas características son; la contracción del embrión dentro de la zona pelúcida y la adquisición de formas alargadas de sus células de la periferia (células trofoblásticas).

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del cultivo embrionario obtenidos en el presente trabajo, se encuentran expuestos en la (Gráfica 1), en donde se observan los porcentajes de desarrollo de los embriones de rata.

En las láminas fotográficas (Láminas 1 y 2) se presentan las características morfológicas que los embriones adquirieron a lo largo de su cultivo en los diferentes suplementos nutritivos.

De los suplementos estudiados, la clara y yema de huevo, así como el agar, fueron los únicos que impidieron el desarrollo de los embriones; encontrándose, que los demás suplementos permitieron en diferentes porcentajes el crecimiento de estos.

De las observaciones realizadas durante el presente estudio, cabe resaltar que los embriones cultivados en el medio que poseía albúmina sérica bovina sufrieron una descompactación parcial de sus blastómeros.

El suplemento nutritivo de rata preñada dió el porcentaje más alto (82 %) de desarrollo embrionario, lo cual se podría explicar por el hecho de que además de ser homólogo, probablemente posee factores (hormonas) que faciliten el desarrollo embrionario.

De manera general todos los suplementos séricos, exceptuando la albúmina, dieron resultados favorables en el cultivo de embriones.

Como ya se mencionó anteriormente, el suero es una mezcla compleja de muchos compuestos, los cuales se encuentran aún pobremente caracterizados, lo cual hace muy difícil poder determinar de manera específica cuál ó cuales elementos que conformen las diversas fracciones influyen de manera directa en el crecimiento embrionario (3).

Sin embargo es posible decir que un suero homólogo es más apropiado para el cultivo de embriones de la misma especie.

No existen diferencias porcentuales en los resultados obtenidos con los embriones cultivados en el medio

suplementado con suero fetal de ternera y suero de ternera (54 % y 52 % respectivamente), por lo que la elección para su utilización en un momento dado podría establecerse por la facilidad de su obtención y costo.

En cuanto al porcentaje de desarrollo embrionario obtenido con el suero humano (74%), sería un poco difícil poder determinar cual componente (es) esta favoreciendo dicho crecimiento.

Allen y col (1) reportan haber obtenido un desarrollo in vitro de mórulas de bovino mayor cuando suplementaron el medio con suero de novillo en comparación con el suero fetal de ternera, los autores sugieren que lo anterior puede ser debido a la existencia de algún componente (es) promotor del crecimiento en el suero de novillo, el cual, puede estar ausente ó parcialmente presente en el suero fetal de ternera. Actualmente Allen y col estan encaminando sus estudios para esclarecer la naturaleza química de dicho componente (es).

Lo anterior es de sumo interés si se desea extrapolar los resultados obtenidos en el presente trabajo para el cultivo de embriones de especies domésticas, debi

-do a que existe una tendencia a utilizar albúmina sérica bovina ó el suero fetal de ternera como medios exclusivos e idóneos para la colecta de embriones de estas especies. Sin embargo con lo observado a lo largo de este trabajo cabría la posibilidad de emplear suero de ternera como una fuente importante de proteína para un medio de recolección, el cual resultaría más económico que los anteriormente mencionados.

Tabla 3.- Resultados obtenidos del cultivo de embriones de rata Wistar en la etapa de ocho células (mórula) en la solución salina con base en Earle enriquecida con diferentes suplementos nutritivos.

B; embriones desarrollados a blastocisto.

M; embriones que permanecieron en el estadio de mórula.

D; embriones que degeneraron durante el cultivo.

Suero de Rata (64%)					Suero de Rata Preñada (82%)						
Estadio	No de replicas					Estadio	No de replicas				
Embrionario	1	2	3	4	5	Embrionario	1	2	3	4	5
B	7	6	6	7	6	B	7	9	8	8	9
M	3	4	3	2	4	M	2	1	2	1	1
D	-	-	1	1	-	D	1	-	-	1	-

Suero de Terners (52%)

Estadío	No de replicas				
Embrionario	1	2	3	4	5
B	6	4	6	5	5
M	3	6	4	5	5
D	1	-	-	-	-

Suero Fetal de Terners (54%)

Estadío	No de replicas				
Embrionario	1	2	3	4	5
B	7	5	6	4	5
M	3	4	4	6	4
D	-	1	-	-	1

Albúmine Sérica B. (35%)

Estadío	No de replicas			
Embrionario	1	2	3	4
B	4	4	3	3
M	6	6	7	6
D	-	-	-	1

Suero Humano (74%)

Estadío	No de replicas				
Embrionario	1	2	3	4	5
B	8	7	8	9	5
M	2	3	2	1	5
D	-	-	-	-	-

Clara y Yema de H. (0%)

Estadío	No de replicas				
Embrionario	1	2	3	4	5
B	-	-	-	-	-
M	9	10	10	8	9
D	1	-	-	2	1

Agar (0%)

Estadío	No de replicas				
Embrionario	1	2	3	4	5
B	-	-	-	-	-
M	6	2	3	7	7
D	4	8	7	3	3

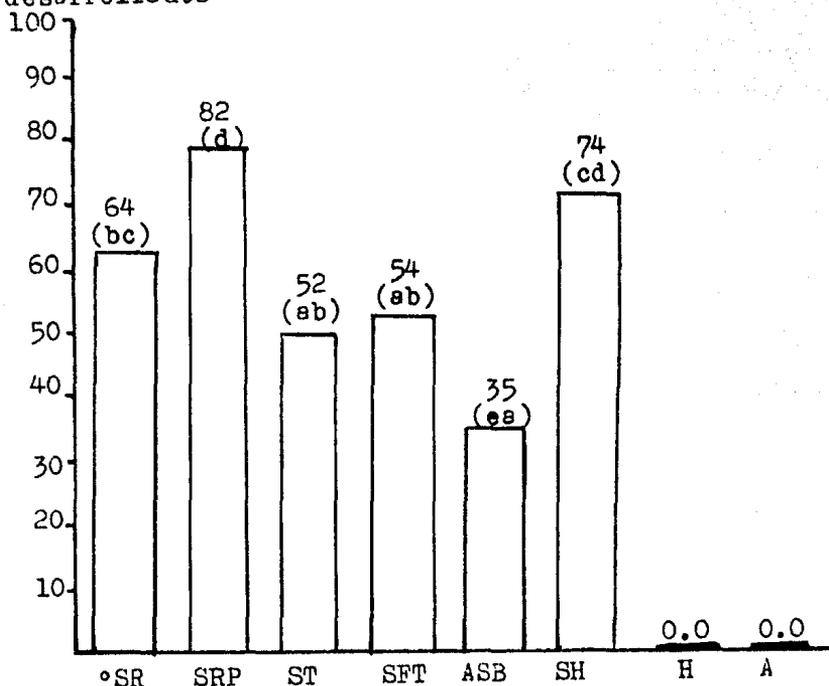
Gráfica 1.- Porcentajes de desarrollo embrionario obtenidos con diferentes suplementos nutritivos.

Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas. Ji Cuadrada.

SR-SRP; ST-SH; SFT-SH = P 0.05

SR-ASB; SRP-ST; SRP-SFT; SRP-ASB; SH-ASB = P 0.01

% de blastocistos desarrollados



- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| ° Suero de Rata (SR) | Albúmina Sérica Bovina (ASB) |
| Suero de Rata Prejada (SRP) | Suero Humano (SH) |
| Suero de Ternera (ST) | Clara y Yema de Huevo (H) |
| Suero Fetal de Ternera (SFT) | Agar (A) |

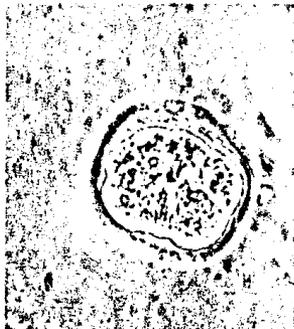
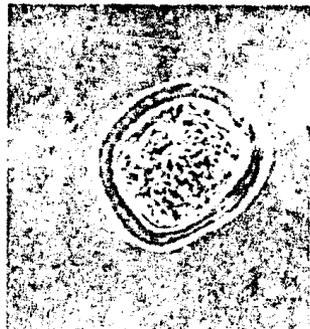
LAMINA FOTOGRAFICA I

A) Embriones normales de ocho células cultivados en diferentes suplementos nutritivos.

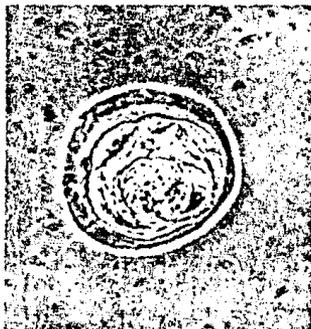
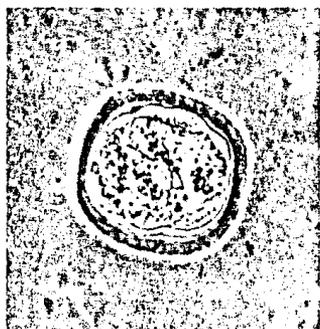
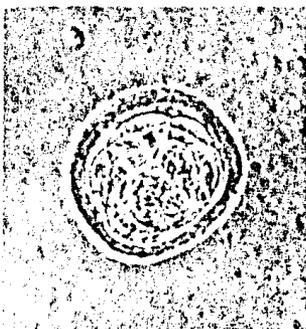
B) Embriones desarrollados a blastocistos cuando fueron cultivados in vitro en diferentes suplementos nutritivos.

LAMINA 1: A) EMBRIONES NORMALES DE 8 CELULAS

50 μ m



B) EMBRIONES DESARROLLADOS IN VITRO



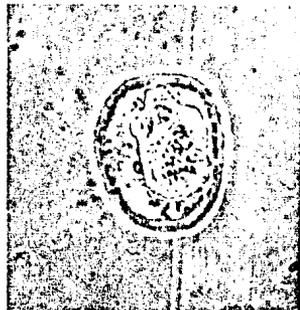
LAMINA FOTOGRAFICA 2

- A) Embriones que no se desarrollaron cuando fueron culti
vados en diferentes suplementos nutritivos.

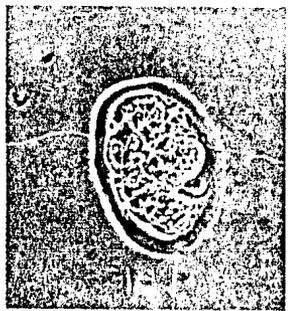
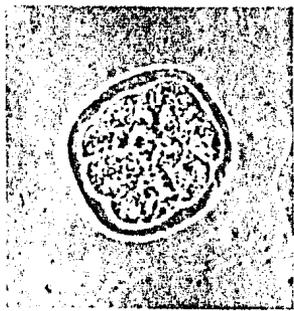
- B) Embriones que degeneraron durante su cultivo en dife
rentes suplementos nutritivos.

LAMINA 2: EMBRIONES NO DESARROLLADOS

50 μ m



B) EMBRIONES DEGENERADOS



VI.- CONCLUSIONES

- 1.- El cultivo de embriones de rata en el laboratorio se ve favorecido cuando se emplean sueros homólogos y suero humano.
- 2.- El suero de ternera y suero fetal de ternera favorecen el desarrollo de los embriones de rata, estos sueros presentan la ventaja de su bajo costo y de su mayor disponibilidad en comparación con los diferentes suplementos nutritivos utilizados en el presente trabajo.
- 3.- Los suplementos clara y yema de huevo, así como el agar no permiten el desarrollo in vitro de los embriones en el laboratorio.
- 4.- Embriones cultivados en medios suplementados con albúmina sérica bovina sufren una alta descompactación celular.
- 5.- El suero de rata preñada fue el medio utilizado que mayor porcentaje de desarrollo embrionario dió, ocupando el segundo lugar el suero humano.

6.- Entre el suero de rata, suero de ternera y suero fe
tal de ternera no hubo diferencias estadísticas
significativas, ocupando estos tres medios el tercer
lugar entre los suplementos nutritivos utilizados.

7.- El suero al ser una mezcla compleja de muchos
compuestos y encontrándose actualmente pobremente
caracterizados, hace difícil poder determinar cual
(es) de estos favorecen ó restringen el desarrollo
embrionario.

Con los conocimientos que se adquieren con este ti
po de trabajos, será posible determinar los requeri --
mientos mínimos indispensables para el cultivo in vitro
de los embriones de las especies domésticas.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allen, R.L., Bondioli, K.R. and Wright, R.W., 1982.
The ability of fetal calf serum, new born calf serum and normal steer serum to promote the in vitro development of bovine morulge.
Theriogenology, 18 (2): 185-189.
- 2.- Austin, C.R., 1960. Fate of spermatozoos in the female genital tract.
J. Reprod. Fert., 1 : 151-156.
- 3.- Barnes, D. Y. Sato, G., 1980. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.
Anal. Biochem., 102 : 255-270.
- 4.- Brinster, R.L., 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source.
J. Exp. Zool., 158 : 59-68.
- 5.- Brinster, R.L., 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy source.

- J. Reprod. Fert. 10 : 227-240.
- 6.- Brinster, R.L., 1974. Embryo development.
J. Anim. Sci., 38 : 1003-1012.
- 7.- Bronson R.A., 1970. Transfer to the mouse oviduct
of eggs with and without the zona pellucida.
J. Reprod. Fert. 22 : 129-137.
- 8.- Farrand, G.D. 1981. Identification, classification
and handling of embryos. Proc. short course in
embryo transfer in beef cattle, Colorado State
Univ., Ft. Collins.
- 9.- Hafez, E.S.E., 1970. Reproduction and breeding
techniques for laboratory animals. 7 th. Ed. Lea
& Febiger, Philadelphia.
- 10.- Hamond, J. Jr., 1949. Recovery and culture of tubal
ova.
Nature, Lond., 163 : 28.
- 11.- Houillon, C. 1974. Sexualidad. 2a. Ed. Omega S. A.,
Barcelona, España.

- 12.- Houillon, CH., 1976. Embriología. 3er. Ed. Omega, Barcelona, España.
- 13.- Hsu, Y. Ch., Bascar, J., Stevens, L.C. y Rash, J., 1974. Development in vitro of mouse mbryos from the two - cell egg stage to the early somi te stage.
- 14.- Hunter, R.H.F., 1982. Fisiología y Tecnología de la Reproducción de la Hembra. Acribia. Esp. p. 362.
- 15.- Johnson, M.H., 1979. Intrinsic and extrinsic factors in preimplantation development. J. Reprod. Fert., 55 : 255-265.
- 16.- Kane M.T. and Hesdon D.R., 1980. The role of co --- mercial bovine serum albumin preparations en the culture of one - cell rabbit embryos to blastocysts. J. Reprod. Fert. 60 : 469-475.
- 17.- Konwinski, M., Solter, D. and Koprowski, H. 1978. Effect of removal of the zona pellucida on subsequent development of mouse blastocysts

in vitro.

J. Reprod. Fert., 54 : 137-143.

18.- Mc. Laren, A. and Biggers, J. . 1958. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos.

Nature., 182 : 877.

19.- Minz, B., 1967. Methods in development biology.

F.H. Wilt and N.K. Wessels. Thomas Y.

Crowell, Neww York.

20.- Pursho tam, N. and Pincus, G., 1961. In vitro cultivation of mammalian eggs.

Anac. Rec., 140 : 51.

21.- Putnam, G. W., 1975. The plasma proteins structure, function and genetic control. 2a Ed. Vol. 1

Academic Press, N.Y.

22.- Rowson, L. E. A. 1971. The role of reproductive research in animal production.

J. Reprod. Fert. 26 113-126.

- 23.- Rugh, R., 1964. Vertebrate embryology. The dynamics of development. Harcourt, Brace & World, Inc. New York.
- 24.- Shea, B. F., 1981. Evaluating the bovine embryo. Theriogenology. 15 : 31-42.
- 25.- Whittingham, D. G., 1973. Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert. 17 : 7-21.
- 26.- Whitten, W. K. 1956. Culture of tubal mouse ova. Nature, Lond. 177 : 96.
- 27.- Wright, R. W. Jr., and Anderson, G. B., blasto - cyst expansion and hatching of bovine ova cultured in vitro. J. Anim. Sci., 43 : 1970-1974. 1976.
- 28.- Wright, R. W. Jr., Cupps, P.T., Gaskins, C. T. and Hillers, J. K.: comparative solubility properties of the zona pellucidae of fertilized murine and bovine ova. J. Anim. Sci., 44 : 850-853 (1977).