

00361

1 lej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MORFOLOGIA Y MICROCIROUGIA EMBRIONARIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

( BIOLOGIA )

P R E S E N T A

JOSE RAUL ASTIAZARAN YBARRA

MEXICO, D.F. 1985.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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:

	Página
I) RESUMEN	1
II) INTRODUCCION	3
A) Desarrollo Embrionario	4
B) Evaluación Embrionaria	7
C) Anormalidades Estructurales	9
D) Microcirugía Embrionaria	12
III) OBJETIVOS	17
IV) MATERIAL Y METODOS	18
A) Obtención de Embriones	18
B) Registro Fotográfico y Estudio Estadístico	19
C) Microcirugía Embrionaria	21
D) Cultivo y Transferencia de Embriones	22
V) RESULTADOS	23
A) Resultados del Estudio Morfológico	23
B) Resultados del Estudio de Microcirugía	27
VI) DISCUSION	31
A) Morfología Embrionaria	31
B) Microcirugía Embrionaria	33
VII) CONCLUSIONES	37
VIII) BIBLIOGRAFIA	38

## I) RESUMEN

En la actualidad se han incrementado considerablemente los estudios en el laboratorio de los embriones de mamíferos en sus estadios de preimplantación, con la finalidad de poder controlar y dirigir su reproducción. Los objetivos del presente trabajo son: a) Realizar un registro fotográfico y clasificación de todos los estadios de preimplantación embrionaria de la rata, tomando en cuenta tanto las etapas morfológicamente normales como todas aquellas que posean alguna alteración; y b) Dividir por la mitad a los embriones de rata en el estadio de mórula, con el propósito de observar si tal procedimiento permite el desarrollo tanto in vitro como in vivo de los hemiembriones resultantes.

Las variaciones embrionarias de rata Wistar, se obtuvieron por fundiendo el oviducto del animal a partir del primer día hasta el sexto día de gestación. Se registraron un total de 144 fotografías de anomalías morfológicas, y se observó que aproximadamente un 20% de los embriones que se obtienen de un animal sufren de alguna alteración. El porcentaje anterior, llega a incrementarse hasta un 80% o más durante el invierno. Los estadios embrionarios empleados en la microcirugía fueron el de mórula y blastocisto temprano, los cuales se dividieron por la mitad empleando microagujas adaptadas a un micromanipulador. Después de la operación, los hemiembriones fueron

cultivados tanto in vitro como in vivo. Ninguno de los hemiembriones se desarrolló in vivo, no así cuando fueron cultivados en el laboratorio, ya que se transformaron en vesículas parecidas a blastocistos (64.6%) principalmente. La forma embrionaria anterior se considera morfológicamente anormal, ya que no posee masa celular interna y por lo tanto no puede progresar in vivo. El desarrollo anterior se debe a que los hemiembriones no aumentaron su número celular durante su cultivo in vitro, sino que comenzaron su etapa de diferenciación teniendo tan solo tres o cuatro células.

## II) INTRODUCCION

Actualmente se ha comenzado a despertar un gran interés hacia la manipulación de embriones tanto de humanos como de animales domésticos. Así, mucha de la información que sobre este campo se ha obtenido, procede de los estudios desarrollados en embriones de animales de laboratorio. (2)

Las formas y tiempos de desarrollo en los estadios de pre-implantación embrionaria son muy similares en la mayoría de los mamíferos (ver cuadro 1).

Estas similitudes de cronología y apariencia en los embriones, indican que los cambios metabólicos de estos en muchas de las especies pueden ser muy semejantes durante los primeros cinco a siete días de desarrollo. (2)

De esta manera, se podría considerar a los animales de laboratorio como buenos modelos para la enseñanza en el área de reproducción. Los conocimientos que se pueden obtener de la manipulación, cultivo y evaluación de estos embriones, pueden servir de base para los trabajos que se desarrollan en especies de importancia económica. (11)

### A) Desarrollo Embrionario.

Momentos después de la ruptura del folículo ovárico, el ovocito cubierto por células foliculares comienza a ingresar en el oviducto en donde va a ser fecundado. Las células de la corona radiada, serán dispersadas a la altura del primer tercio del oviducto por la acción de las enzimas acrosomales de los espermatozoides antes de que el embrión alcance el estadio de dos células. (21)

Durante la fecundación, el ovocito libera su segundo corpúsculo polar, el cual puede permanecer en el interior del espacio perivitelino hasta que el embrión ha alcanzado el estadio de blastocisto, no así el primer corpúsculo el cual degenera uno o dos días después de su formación. (21)

Cuando la monta de la hembra se efectúa, esta precede regularmente a la ovulación de una a cinco horas en las diversas cepas de ratones estudiados. La ovulación es un fenómeno rápido y toma aproximadamente una hora en llevarse a cabo. (9)

Una vez que el ovocito ha sido liberado de las células foliculares, se le pueden observar las siguientes estructuras:  
(ver figura 1)

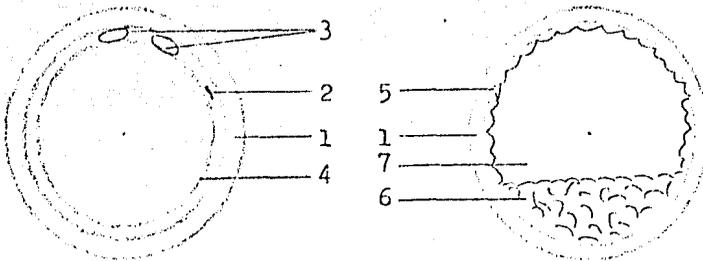
- 1) Zona pelúcida
- 2) Espacio perivitelino

- 3) Corpúsculos polares
- 4) Membrana citoplásmica

Momentos después de que la fecundación del ovocito se ha llevado a cabo, el embrión comienza a descender hacia la región uterina. Durante este trayecto el embrión sufre una serie de divisiones mitóticas llamadas segmentaciones, las cuales suelen ser sincrónicas y dan progresivamente como resultado células de menor tamaño llamadas blastómeros. (29)

Las células que integran a un embrión conforme se van dividiendo, no incrementan su volumen citoplásmico que es lo que generalmente se observa en otras líneas celulares posteriores. De esta manera, el diámetro embrionario no sufre variación, por lo que la etapa de blastocisto es ligeramente mayor al del óvulo. (10)

Algunos autores consideran que el estadio de mórula es cuando el embrión posee en su interior aproximadamente unas treinta y dos células o más, sin observarse aún ninguna cavidad o espacio en su interior. Sin embargo, la mayoría de las especies que desarrollan blastocistos pequeños como es el caso del ratón, rata y hamster, se ha encontrado que el inicio de la cavidad o espacio blastocélico comienza a formarse en embriones que poseen menos de dieciséis células, por lo que es más conveniente denominar al estadio de mórula como aquella etapa en que un embrión posee más de ocho células sin contener



Embrión de una célula

Blastocisto

FIGURA I) Estructuras embrionarias

- 1) Zona pelúcida, 2) Espacio perivitelino,
- 3) Corpúsculos polares, 4) Membrana cito-plásmica, 5) Células trofoblásticas, 6)
- Células de la masa celular interna y,
- 7) Espacio blastocélico.

(Hunter, 1982)

en su interior espacio alguno. (33)

Cuando en el interior del embrión se comienza a delimitar una pequeña cavidad se considera que la formación de la etapa de blastocisto se ha iniciado. (2)

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 y las células trofoblásticas (ver figura 1).(5)

## B) Evaluación Embrionaria.

La evaluación de los embriones en sus estadios de preimplantación, es muy importante en todos los estudios tanto de laboratorio como de campo en donde la manipulación, transferencia y desarrollo embrionario se estén llevando a cabo.

Existen diversas pruebas que se emplean actualmente para determinar la viabilidad de los embriones, como son por ejemplo:

- 1) El consumo de glucosa (27)
- 2) La actividad enzimática (26)
- 3) El consumo de aminoácidos (26)
- 4) El desarrollo in vitro (38)
- 5) El cultivo in vivo (13)
- 6) La morfometría y ultraestructura (1)
- 7) El análisis cinematográfico (20)
- 8) Las tinciones fluorescentes (30)
- 9) La morfología embrionaria (32)

Sin embargo, muchas de las pruebas anteriores requieren de equipos o metodologías complejas para poderse llevar a cabo, así como largos períodos de cultivo in vitro de los embriones,

CUADRO I) Cronología del desarrollo embrionario de diferentes especies. (Adaptado de: Brinster, 1974 y Hafez, 1962, 1970).

ESPECIE	ESTADIO EMBRIONARIO (días)					
	2 cel.	4 cel.	16 cel. (mórula)	Entrada al útero	Elasto- ciato	Implanta- ción
Gato (+)	3 (AM)	3 (PM)	4	4-8	5-6	13-14
Hurón (+)	3	3 (PM)	4-5		6-7	11-12
Cobayo (.)	3	4	5		5 (PM)	6
Visón (+)	3	4	5-6		6-7	retardada
Ratón (.)	2	3 (AM)	3 (PM)	3-4	4 (AM)	5 (AM)
Conejo (+)	2	2 (PM)	3 (AM)	3-4	3 (PM)	7
Rata (.)	2	3 (PM)	4 (PM)	4-5	5	5-6
Cerdo	2 (PM)		3-4	2-3	5-6	10-12
Oveja	2		4	2-4	6-7	17-18
Vaca	2		6	3-4	7-9	30-55
Hombre		2		3	5-8	8-13
Hamster (.)	2	3	4 (AM)	4	4	5
Macaco	2	3 (AM)	3 (PM)		5	9

AM) En la mañana ; PM) En la tarde.

.) Especies con ovulación espontánea; el día uno es el día de la detección de los espermatozoides.

+) Especies con ovulación inducida; el día uno es el día de la monta.

por lo que se vuelven hasta cierto punto poco prácticos e inaccesibles. (18)

No así, el estudio morfológico de los embriones el cual es uno de los métodos de evaluación más utilizado en la actualidad. (32)

Los parámetros morfológicos que generalmente se emplean para la evaluación de los embriones son: la forma, el color, el número y compactación de las células, el tamaño de espacio perivitelino, el número de blastómeros degenerados o no integrados y el número y tamaño de las vesículas. (18)

Si se designan diferentes grados de puntuación a los parámetros anteriores, se podrá clasificar a los embriones como buenos, regulares o malos. (18)

El tamaño embrionario no es el mismo entre una especie y otra, mas aún, existen variaciones dentro de la misma especie (ver cuadro 2).

### C) Anormalidades Estructurales.

Actualmente no existe mucha información sobre la frecuencia con que se presentan las anomalías en los embriones de las diferentes especies.

CUADRO 2) Dimensiones embrionarias de diferentes especies.  
(Houillon, 1974)

ESPECIE	DIAMETRO ( $\mu\text{m}$ )
Vaca	160
Yegua	135
Perra	140
Coneja	120 - 130
Gata	120 - 130
Mona	110 - 120
Rata	75 - 96
Ratón	75
Humano	125 - 135

Hafez (6) reporta haber observado el 1.6% y el 4% de anomalías en los embriones de conejo y oveja respectivamente.

Las anomalías estructurales de los embriones según Hafez (6), pueden ser debido a factores citológicos, fisiológicos, genéticos, ambientales y patológicos.

Dentro de los factores citológicos y fisiológicos que pueden causar malformaciones se encuentran: a) La falta de maduración de los ovocitos, lo que trae como consecuencia la retención de los corpúsculos polares y la formación de embriones poliploides

los cuales degeneran posteriormente. b) La degeneración de la cromatina del ovocito como respuesta al retraso de la fecundación. Si la fecundación no se lleva a cabo, el ovocito tiende a dividirse de manera partenogenética llamándose a tal proceso fragmentación, el cual se presenta con mayor frecuencia en los animales inmaduros sexualmente que han sido tratados con gonadotropinas. (6)

Dentro de los factores genéticos que pueden provocar anomalías en los embriones se encuentran, la presencia de genes letales tanto en el ovocito como en el espermatozoide. (6)

Los factores ambientales influyen de manera importante en el desarrollo embrionario, ya que se ha visto que la frecuencia de anomalías se incrementa en las especies durante el invierno (8). Así mismo, Hunter (13) reporta haber encontrado un aumento en las malformaciones de los embriones de oveja cuando estos animales se encuentran sujetos a temperaturas altas.

Dentro de las alteraciones estructurales de los embriones se encuentran las variaciones de tamaño, forma, compactación y pigmentación citoplásmica de estos. El polimorfismo de los blastómeros en el embrión es un fenómeno normal, sin embargo, si estas variaciones de tamaño y forma exceden los límites promedio de la especie, se podría considerar entonces como un signo patológico. (7)

La falta de correlación entre el estadio embrionario y la edad de gestación se llama asincronía embrionaria, la cual es frecuente observar en las diversas especies.

Los embriones asincrónicos generalmente poseen una morfología normal, sin embargo por encontrarse retrasados uno o dos días en el desarrollo, su viabilidad es menor cuando se comparan con aquellos que se encuentran en el estadio adecuado. (6)

#### D) Microcirugía Embrionaria.

El incremento en el potencial reproductivo de algunas especies de animales domésticos, ha sido llevado a cabo utilizando métodos de superovulación y transferencia de embriones. Sin embargo, es posible obtener un mayor aumento de este potencial empleando técnicas de microcirugía embrionaria. (31)

El primer trabajo experimental diseñado para estudiar el grado de desarrollo de blastómeros aislados en mamífero, fué elaborado por Nicholas y Hall en 1942, quienes encontraron que ambos blastómeros de un embrión de rata de dos células poseían la capacidad de desarrollo. (24)

A partir de entonces, la microcirugía ha venido siendo utilizada como una herramienta para el estudio de la regulación de los embriones en sus estadios de preimplantación. (4,25,34,36)

Los trabajos realizados tanto por Scidel como por Tarkowski han mostrado que la mayoría de los blastómeros obtenidos a partir de un embrión de dos células, pueden autorregularse y dar origen a blastocistos típicos, aunque de menor tamaño que los normales, sin embargo, algunos se desarrollan en vesículas trofoblásticas que carecen de las células de la masa celular interna. (35,36)

Tarkowski (34) ha observado en algunos casos, que mórulas de ratón desarrolladas a partir de blastómeros aislados no sufren una cavitación posterior. En el caso del conejo, los blastómeros aislados del estadio de cuatro células pueden dar origen ya sea a blastocistos o a vesículas trofoblásticas. Sin embargo, la incidencia de esta última forma embrionaria es mayor a partir de blastómeros aislados de un embrión de cuatro células que uno de dos células.

Kelly (15) ha encontrado que los blastómeros aislados de un embrión de ocho células de ratón, poseen aún la potencialidad de originar blastocistos normales. De esta manera, Moore (23) piensa que conforme aumenta el desarrollo de los blastómeros en el embrión, decrece la posibilidad de que estos puedan crecer normalmente de manera aislada, por lo que es más frecuente observar vesículas trofoblásticas cuando se cultivan blastómeros de estadios avanzados.

La capacidad de desarrollo tanto de las células de la masa

celular interna como de las trofoblásticas aisladas, ha sido estudiada por Gardner (4), el cual ha observado que las vesículas desarrolladas a partir de células trofoblásticas puras, son incapaces de agregarse in vitro y de progresar in vivo, sin embargo, pueden producir la reacción decidual en el útero. Contrariamente, las células de la masa celular interna si pueden agregarse pero no implantarse, por lo que un embrión debe de contener ambos tipos celulares para poder progresar posteriormente de manera normal.

Rossant (28) sostiene que la mortandad de los embriones formados a partir de blastómeros de estadios avanzados, se debe principalmente a la cantidad insuficiente de células embrionarias en el momento de la diferenciación, y no a la falta de totipotencialidad de estas. Debido a que la formación del blastocisto comienza al mismo tiempo en blastómeros aislados que en el embrión intacto, la falta de células en este momento hace que los blastómeros aislados de un embrión de cuatro y ocho células, no desarrollen una masa celular interna funcional. Aunado a lo anterior, este mismo autor ha observado que se requiere de un mínimo de este tipo celular para que se lleve a cabo la implantación normal del embrión.

Willadsen y col. (39) han observado que cuando una mórula de bovino que cuenta con unas treinta a sesenta células, se divide mecánicamente por la mitad y posteriormente se cultiva, se obtienen blastocistos normales. Sin embargo, cuando se di-

vide a un embrión que posee cuatro células, los fragmentos resultantes tienden a formar generalmente vesículas trofo-blásticas.

Recientemente, se ha comenzado a emplear la microcirugía con grandes resultados para la división de embriones de animales domésticos. (16,17,39,40)

#### 1) Cultivo y Transferencia de Hemiembriones.

Para poder realizar las técnicas microquirúrgicas de división de embriones, es indispensable eliminar la zona pelúcida, lo cual representa una serie de dificultades en el desarrollo posterior de los embriones seccionados, denominados también hemiembriones.

Si se transfieren embriones sin zona pelúcida antes de la etapa de blastocisto, al oviducto (23) o al útero del animal (39), estos no podrán desarrollarse debido a:

- a) La fagocitosis de los embriones por leucocitos.(23)
- b) La posible disgregación de los blastómeros que integran al embrión.(14,37)
- c) La posible implantación de los embriones a las paredes del oviducto.(22)
- d) La posible agregación entre los mismos embriones.(22)

Tomando en cuenta lo anterior, Bronson (3) y Massey (19) sugieren que la zona pelúcida es indispensable para el desarrollo in vivo de los embriones de mamífero.

Sin embargo, Willadsen (39) comenta que los homiembriones de una mórula de bovino no requieren de zona pelúcida para desarrollarse en el lumen uterino del animal, si previamente a la transferencia son cultivados en el laboratorio para permitir su compactación.

Tarkowski y col. (34) comentan que el cultivo in vitro de los homiembriones hasta la etapa de blastocisto, es indispensable para asegurar su desarrollo después de que sean transferidos a una receptora.

### III) OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- a) Realizar una clasificación y registro fotográfico de todos los estadios de preimplantación embrionaria de rata, tomando en cuenta tanto las etapas morfológicamente normales como aquellas que posean alguna alteración.
- b) Estudiar si la división mecánica de un embrión de rata en el estadio de mórula o blastocisto temprano, permite el desarrollo posterior tanto in vivo como in vitro de las estructuras embrionarias resultantes.

#### IV) MATERIAL Y METODOS

##### A) Obtención de Embriones.

Se utilizaron ratas Wistar cuyas edades fluctuaron entre tres y cuatro meses. Los embriones estudiados se obtuvieron tomando en cuenta la cronología del desarrollo embrionario mencionada en el cuadro 3.

Para la recuperación de los embriones se procedió de la siguiente manera: se sacrificó el animal por medio de una dislocación cervical. Su región ventral se esterilizó empleando una solución diluida de benzal, para posteriormente efectuar en esta región una incisión en forma de "V" con la finalidad de poner al descubierto el aparato reproductor.

Se disecó el oviducto junto con el útero y se sumergió en una solución salina estéril para la obtención de los embriones; se perfundió el oviducto en su región fimbriada utilizando una aguja del número 27 y pinzas de relojero.

Se requirieron de uno a dos mililitros de medio para lograr perfundir completamente el órgano. El líquido de perfusión se colectó en vidrios de reloj para su posterior observación al microscopio.

Todos los embriones colectados se lavaron tres veces en medio fresco. Las operaciones de obtención y traslado de los embrio

nes, se realizó con una pipeta Pasteur cuya punta poseía un diámetro de 150  $\mu$ m, con la finalidad de coleccionar el mínimo medio posible junto con los embriones cuando estos fueron transferidos.

Todo el material de vidrio utilizado fue siliconado previamente empleando una solución acuosa de silicón al 1%.

#### B) Registro Fotográfico y Estudio Estadístico.

Los embriones coleccionados desde el día uno hasta el sexto día de gestación, se colocaron en portaobjetos para posteriormente ser fotografiados empleando un microscopio de contraste de fase con cámara integrada (+). La fotografía de los embriones se realizó a doscientos aumentos.

Se utilizó película para impresiones en blanco y negro (++) . Aproximadamente se emplearon mil trescientos embriones procedentes de ciento ochenta hembras para el registro morfológico.

La prueba estadística que se utilizó para analizar los resultados fue el diagrama de flujo.

---

+) Olympus, Tokyo

++) Kodak, Panatomic - X; FX - 135; asa 32

CUADRO 3) Cronología del desarrollo embrionario en las etapas de preimplantación de la rata (el día uno es el día de la detección del tapón vaginal).

DIA DE GESTACION		ESTADIO EMBRIONARIO
UNO	AM	Ovulos recién fecundados
	PM	1 Célula +++
DOS	AM	2 Células +++
	PM	4 Células +
	AM	4 Células +++
TRES	PM	4 Células +++
	AM	4 Células +
CUATRO	PM	8 Células +++
	AM	Mórulas +
CINCO	PM	Blastocistos +++
	AM	Blastocistos elongados +++
SEIS	PM	

+) Frecuencia de obtención del estadio embrionario.

+, menor ; +++, mayor

C) Microcirugía Embrionaria.

Los estadios embrionarios que se emplearon para la microcirugía fueron los de mórula y blastocisto temprano, los cuales una vez obtenidos se colocaron en una solución fosfatada de Dulbecco (PBS) suplementada con: 1 g/lit de glucosa, 0.028 g/lit de piruvato de sodio, 100 UI/ml de penicilina G sódica y 20% de suero de rata. Los embriones se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C) durante dos horas.

La zona pelúcida de los embriones fue eliminada empleando una solución de 0.5% de pronasa en solución salina con base en Earle. Posteriormente, los embriones fueron lavados tres veces en PBS suplementada.

La microcirugía de los embriones se realizó de la siguiente manera: los embriones se colocaron en una solución PBS suplementada en cajas de petri previamente siliconadas. Posteriormente, utilizando una micropipeta de sujeción con un diámetro interno de 40  $\mu$ m y dos microagujas de diámetro de 1 a 2  $\mu$ m, se dividieron los embriones por la mitad dando origen de esta manera a dos hemiembriones. Los microinstrumentos se encontraron adaptados a un micromanipulador (+).

---

+) E. LEITZ WETZLAR

#### D) Cultivo y Transferencia de Embriones.

Una vez obtenidos los 260 hemiembriones procedentes de ciento cuarenta embriones, se dividieron en dos grupos: el primero se transfirió al interior del útero de quince hembras pseudogestantes en el cuarto día, y el segundo grupo se cultivó a 37°C en el laboratorio, utilizando medio de Earle suplementado con 1 g/lit de glucosa, 0.028 g/lit de piruvato de sodio, 100 UI/ml de penicilina G sódica y 20 % de suero de rata.

Después de un período de 24 horas, se sacrificaron las hembras receptoras y se procedió a evaluar los hemiembriones de ambos grupos.

Para la transferencia de los embriones se procedió de la siguiente manera: se anestesió el animal por medio de vapores de éter, para posteriormente efectuarle una pequeña incisión en su región medio lateral y extraerle su cuerno uterino.

Con la ayuda de una aguja, se realizó una pequeña punción en la región útero-tubárica del órgano para facilitar la introducción de la punta de la pipeta de transferencia. Se transfirieron en cada cuerno cinco embriones o en su caso hemiembriones en un volumen de 1 µl de medio. Una vez terminada la operación, se regresó el órgano a su lugar y se procedió a realizar la sutura.

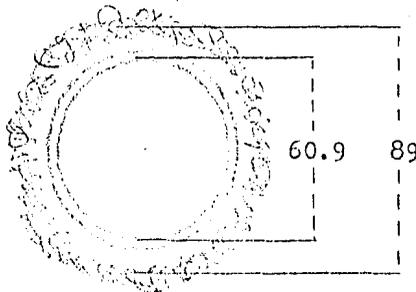
## V) RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran agrupados en los siguientes dos incisos:

### A) Resultados del Estudio Morfológico.

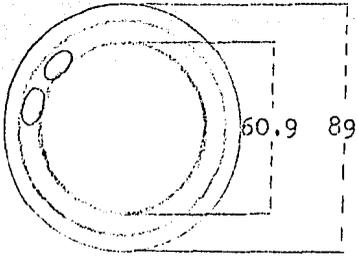
A continuación se presentan las características morfométricas, así como la secuencia fotográfica de los distintos estadios de preimplantación embrionaria en la rata Wistar.

1) Características morfométricas de los principales estadios de preimplantación embrionaria. El grosor de la zona pelúcida es de  $6.6 \mu\text{m}$  y es uniforme en todas las etapas embrionarias. Las dimensiones de los esquemas se encuentran expresadas en micrómetros,  $\mu\text{m}$ .

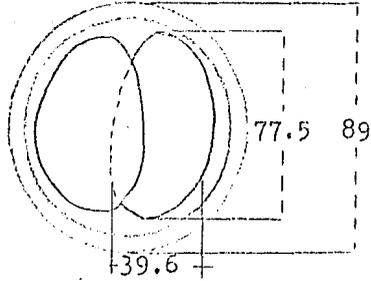


Ovocito

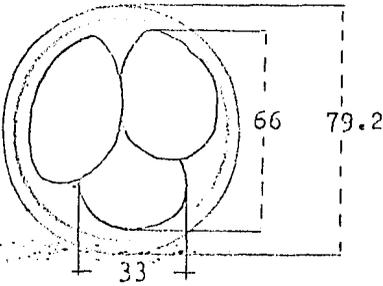
CARACTERISTICAS MORFOMETRICAS DE LOS EMBRIONES DE RATA.



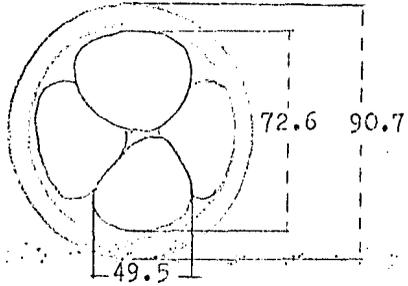
Embrión de una célula



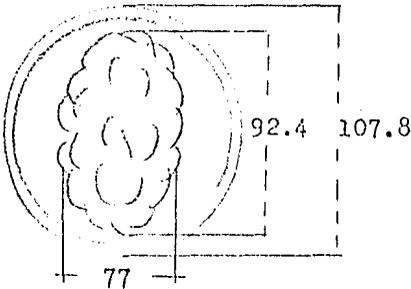
Embrión de dos células



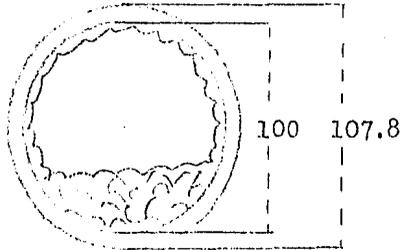
Embrión de tres células



Embrión de cuatro células



Mórula



Blastocisto

2) Secuencia fotográfica de todos los estadios de preimplantación embrionaria en donde se observan tanto las formas normales como aquellas que poseen alguna alteración.

LAMINA I : Estadios de preimplantación de morfología normal.

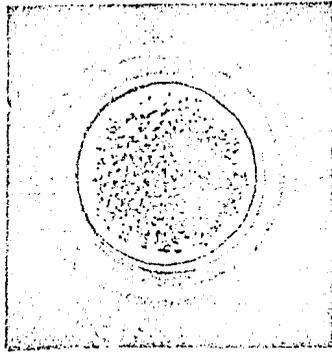
- 1) Ovulo cubierto por células de la corona radiada, obtenido por punción del folículo ovárico.
- 2) Embrión de una célula, obtenido en la tarde del primer día de gestación.
- 3) Embrión de dos células, obtenido en la mañana del segundo día de gestación.
- 4) Embrión de tres células, obtenido en la mañana del tercer día de gestación.
- 5) Embrión de cuatro células, obtenido en la tarde del tercer día de gestación.
- 6) Embrión de ocho células, obtenido en la tarde del cuarto día de gestación.
- 7) Mórula, obtenida en la mañana del quinto día de gestación.
- 8) Blastocisto, obtenido en la mañana del quinto día de gestación.
- 9) Blastocisto elongado, obtenido en la mañana del sexto día de gestación.

LAMINA I

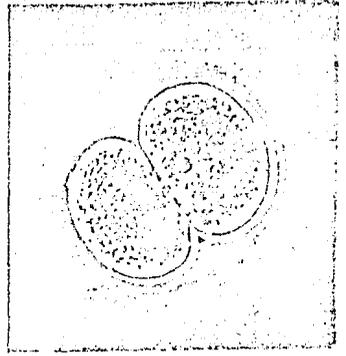
100  $\mu$ m



1



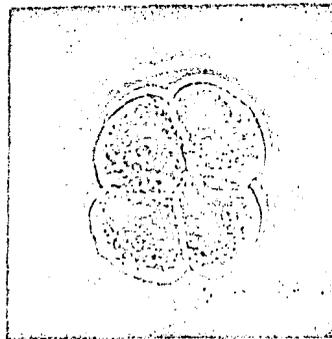
2



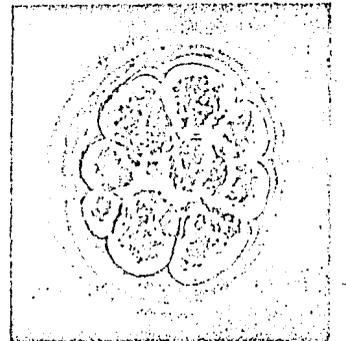
3



4



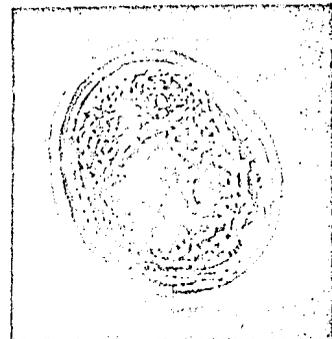
5



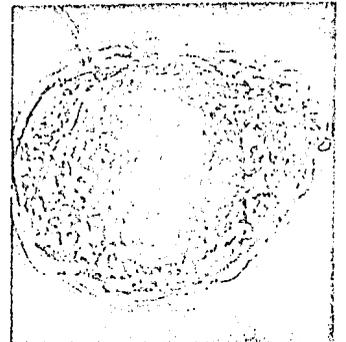
6



7



8

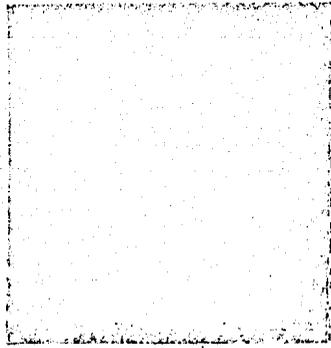


9

LAMINA II : Ovocitos.

- 1), 2) y 3) Ovocitos cubiertos por células foliculares de la corona radiada, obtenidos por punción del foliculo ovárico.

LAMINA II  
100 μm



1



2

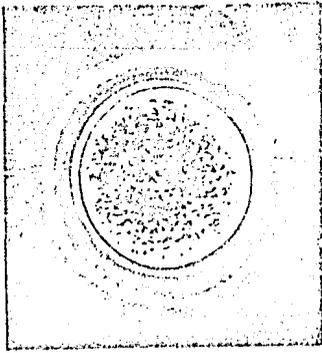


3

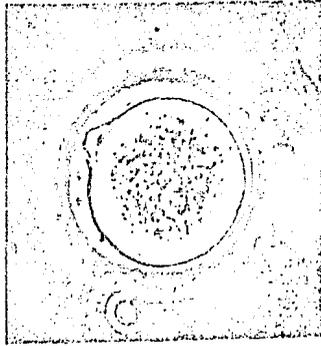
LAMINA III : Variaciones morfológicas del estadio de una célula, obtenidos en la tarde del primer día de gestación.

- 1 a 4) Secuencia de fertilización en donde se observa el cono de fecundación (fotografía 2), y la formación del espacio perivitelino (fotografías 3 y 4).
- 5) Embrión con cabeza y cola de espermatozoide, así como detritos celulares en el interior del espacio perivitelino.
- 6) Estrangulamiento del embrión por la zona pelúcida.
- 7) Resto celular embrionario en el interior de una zona pelúcida fracturada.
- 8) Fragmento embrionario sin zona pelúcida.

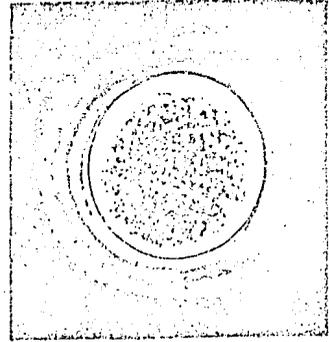
LAMINA III  
100  $\mu$ m



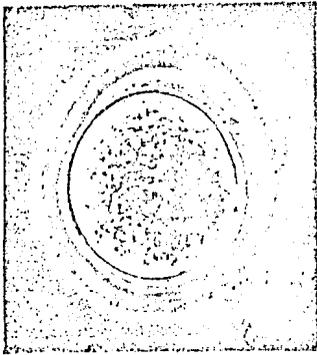
1



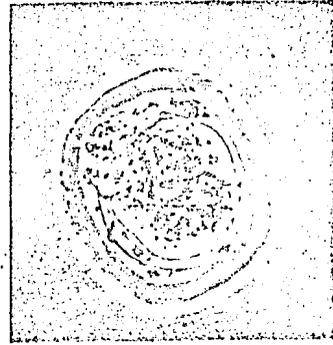
2



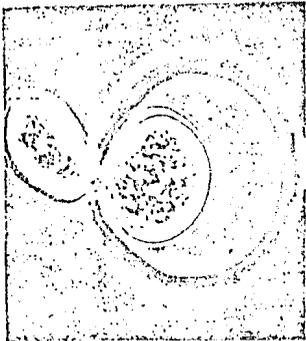
3



4



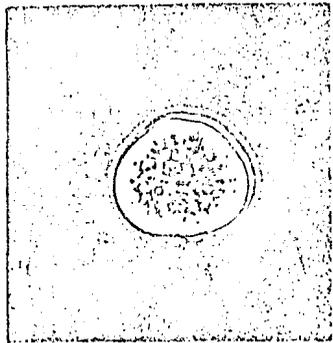
5



6



7

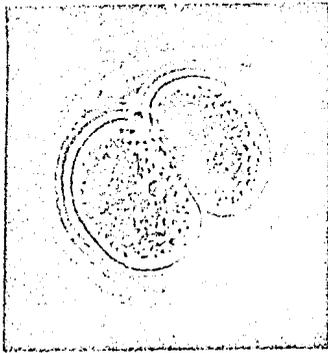


8

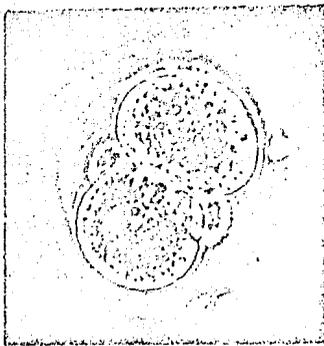
LAMINA IV : Variaciones morfológicas del estadio de dos células, obtenidas en la mañana del segundo día de gestación.

- 1) Embrión de morfología normal.
- 2) Embrión normal con corpúsculos polares en el espacio perivitelino.
- 3 a 5) Embriones normales con blastómeros ligeramente alargados.
- 6 a 9) Embriones con blastómeros de morfología variable.

LAMINA IV  
100  $\mu$ m



1



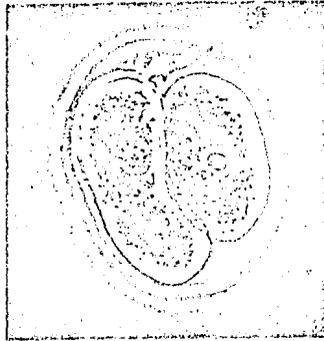
2



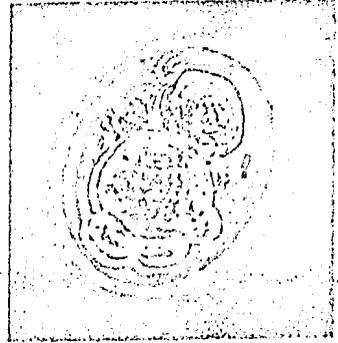
3



4



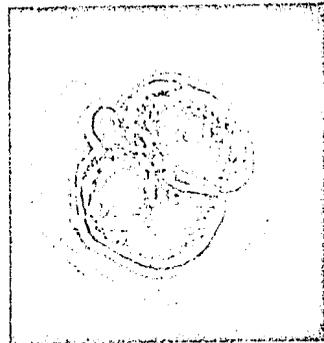
5



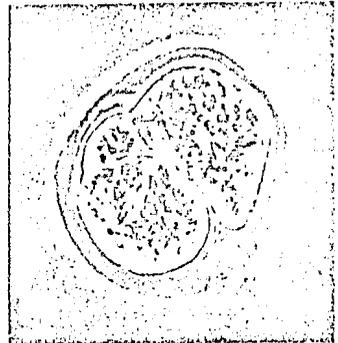
6



7



8



9

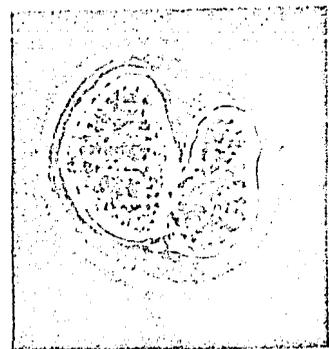
LAMINA V : Variaciones morfológicas del embrión de dos células,  
obtenidos en la mañana del segundo día de gestación.

1 a 4) Embriones con blastómeros de morfología variable.

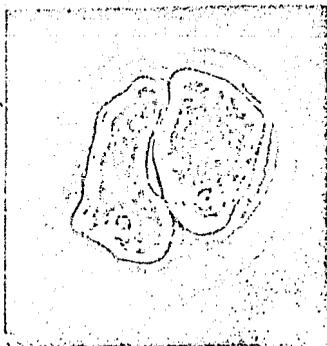
5 a 8) Embriones con un blastómero disuelto.

9) Embrión con ambos blastómeros disueltos en donde se  
observa además los corpúsculos polares.

LAMINA V  
100μm



1



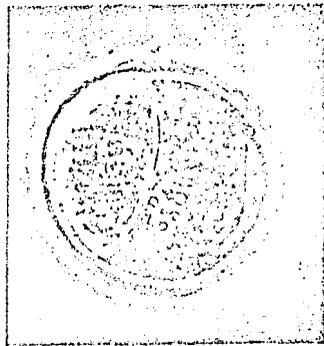
2



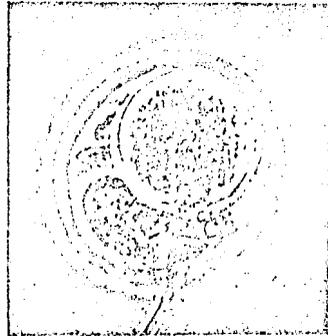
3



4



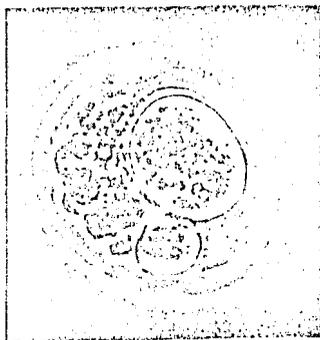
5



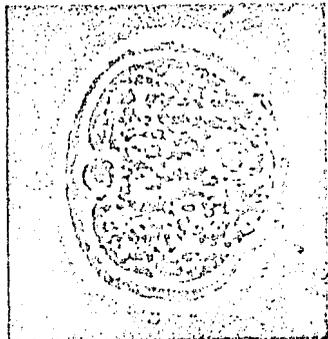
6



7



8



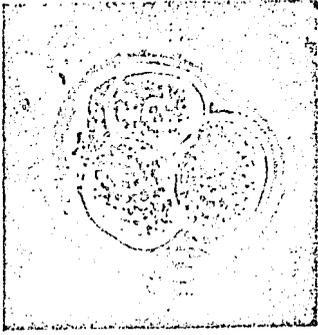
9

LAMINA VI : Variaciones morfológicas del embrión de tres células, obtenidos en la mañana del tercer día de gestación.

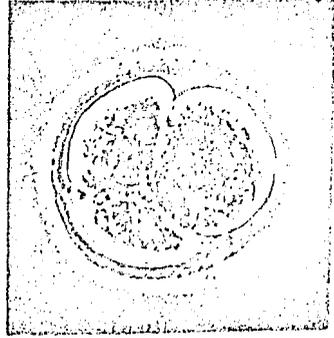
1 a 3) Embriones de morfología normal.

4 y 5) Embriones de morfología variable.

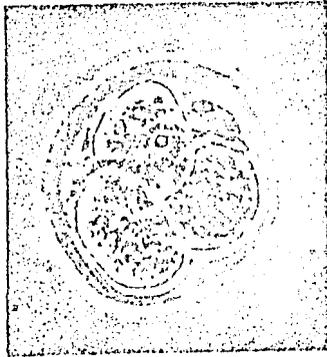
LAMINA VI  
100  $\mu$ m



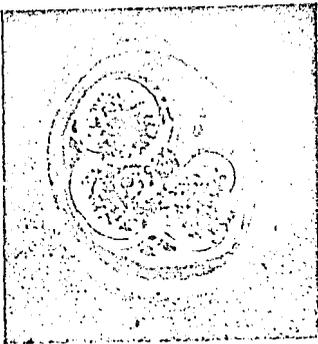
1



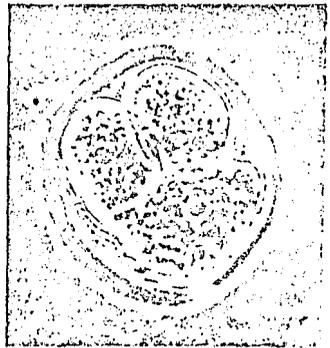
2



3



4



5

LAMINA VII : Variaciones morfológicas del embrión de tres células, obtenidos en la mañana del tercer día de gestación.

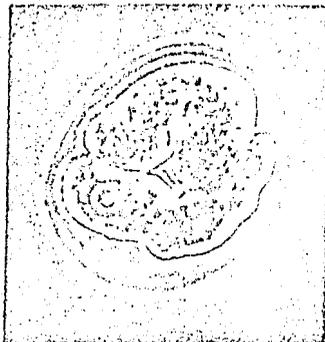
- 1) Embrión con blastómeros irregulares.
- 2) Embrión con blastómeros elongados.
- 3) Embrión con dos blastómeros alargados rodeando al tercero.
- 4 y 5) Embriones con uno y dos blastómeros disueltos respectivamente.

LAMINA VII

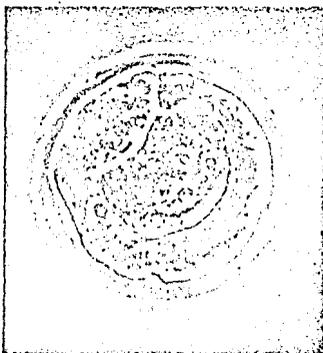
100  $\mu$ m



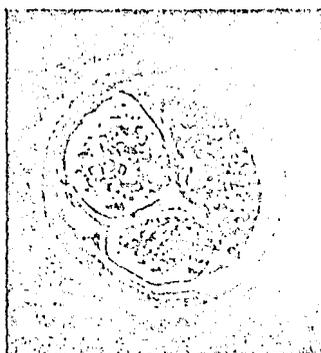
1



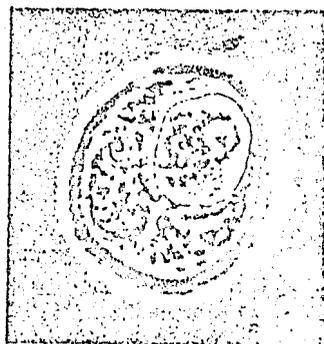
2



3



4



5

LAMINA VIII : Variaciones morfológicas del embrión de cuatro células, obtenidos en la tarde del tercer día de gestación.

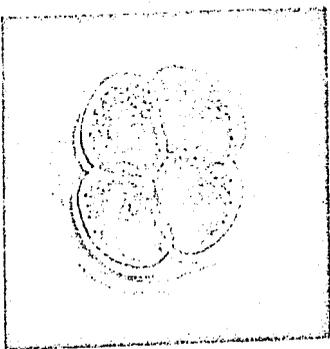
1) Embrión de morfología normal.

2) Embrión chico con restos celulares en el espacio perivitelino.

3 y 4) Embriones de morfología variable.

LAMINAVIII

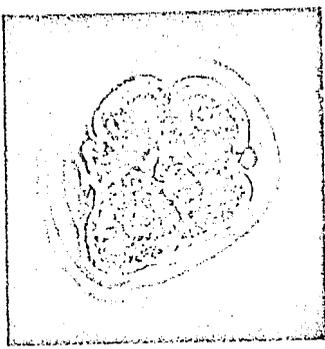
100 μm



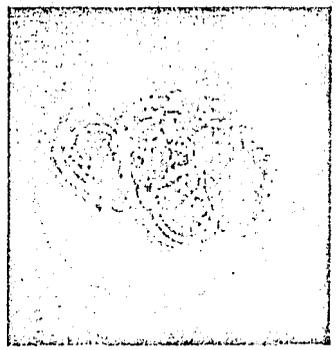
1



2



3



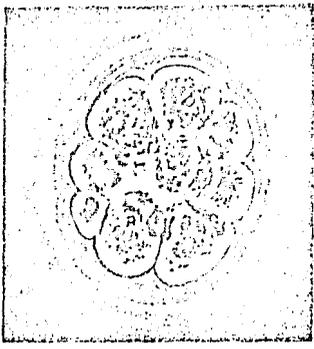
4

LAMINA IX : Variaciones morfológicas del embrión de ocho células, obtenidos en la tarde del cuarto día de gestación.

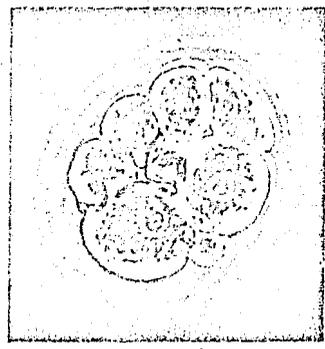
1 a 7) Embriones de morfología normal, con diversos grados de compactación y tamaño.

8 y 9) Embriones de morfología variable.

LAMINA IX  
100 μm



1



2



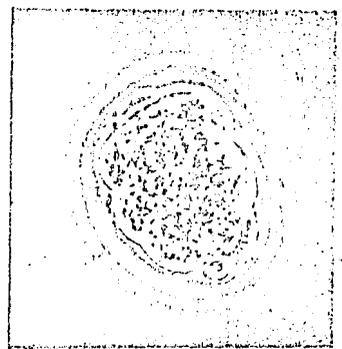
3



4



5



6



7



8



9

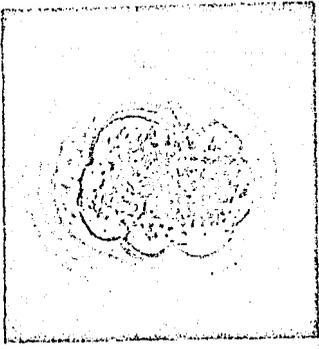
LAMINA X : Variaciones morfológicas del embrión de ocho células, obtenidos en la tarde del cuarto día de gestación.

1) Embrión de morfología normal.

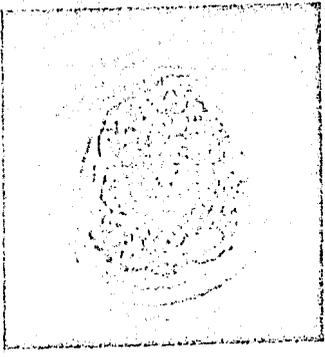
2 a 9) Embriones degenerados con diversos grados de opacidad citoplasmática.

LAMINA X

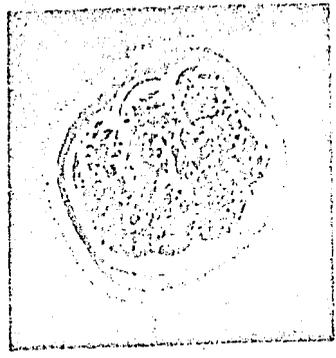
100  $\mu$ m



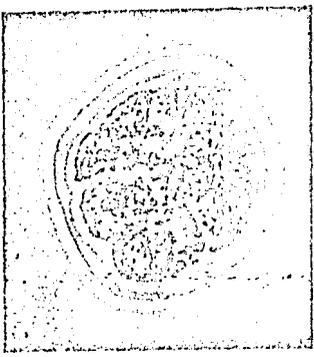
1



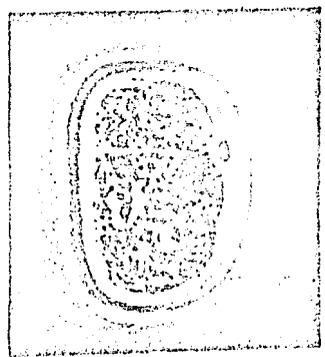
2



3



4



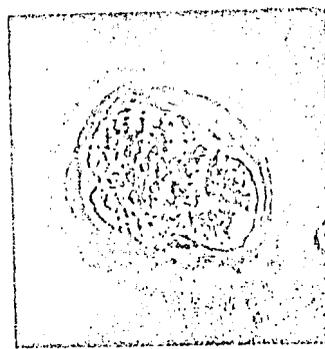
5



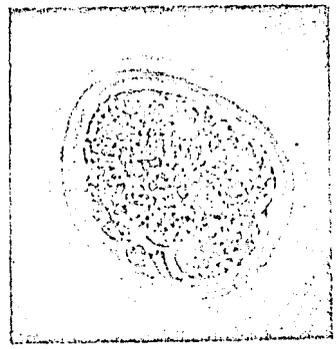
6



7



8



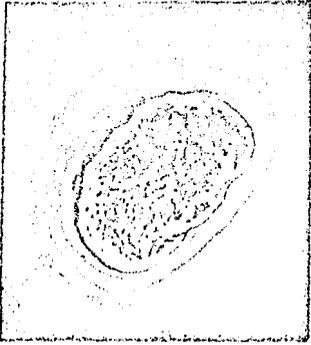
9

LAMINA XI : Variaciones morfológicas del estadio de mórula, .  
obtenidos en la noche del cuarto día de *gestación*.

1 a 5) Mórulas de morfología normal.

6 a 8) Mórulas de morfología variable.

LAMINA XI  
100  $\mu$ m



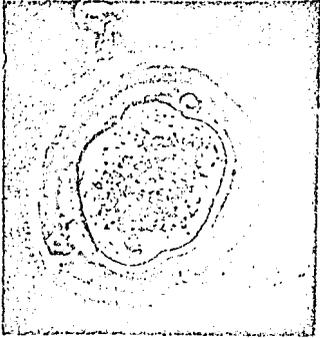
1



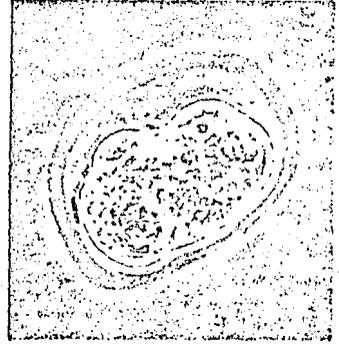
2



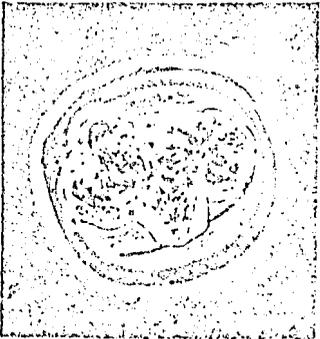
3



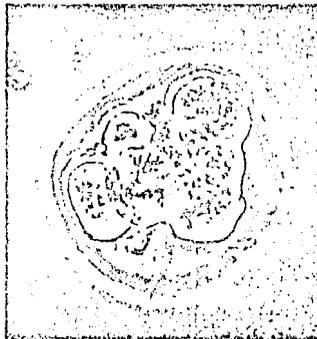
4



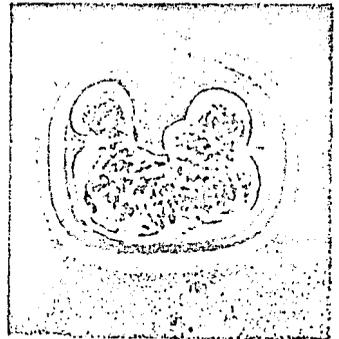
5



6



7



8

LAMINA XII : Variaciones morfológicas del estadio de mórula,  
obtenidos en la noche del cuarto día de gestación.

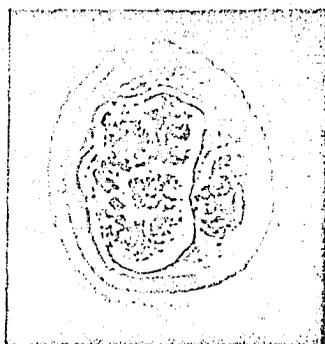
- 1 a 4) Mórulas chicas con restos celulares en el espacio perivitelino.
- 5) Mórula chica con dos blastómeros no integrados.
- 7) Mórula degenerada, con la zona pelúcida grande y restos celulares en el espacio perivitelino.
- 8) Mórula descompactada.

LAMINA XII

100  $\mu$ m



1



2



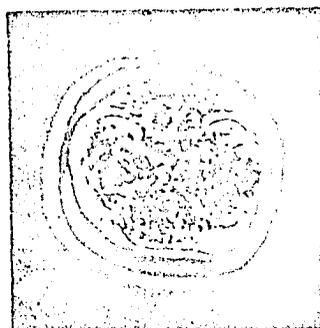
3



4



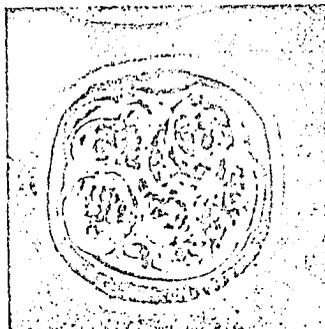
5



6



7



8

LAMINA XIII : Variaciones morfológicas del estadio de mórula,  
obtenidos en la noche del cuarto día de gestación.

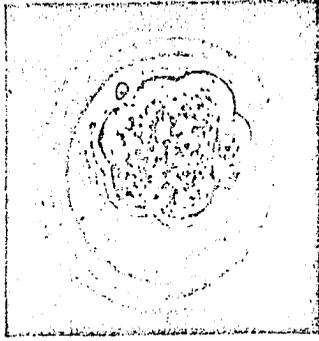
- 1) Mórula anormal con blastómeros no integrados.
- 2) Mórula chica.
- 3) Mórula chica con la zona pelúcida alargada.
- 4) Mórula chica con una vesícula en el espacio perivitelino.
- 5 a 7) Mórulas chicas con restos celulares en el espacio perivitelino.
- 8) Mórula chica con restos celulares en el espacio perivitelino.

LAMINA XIII

100  $\mu$ m



1



2



3



4



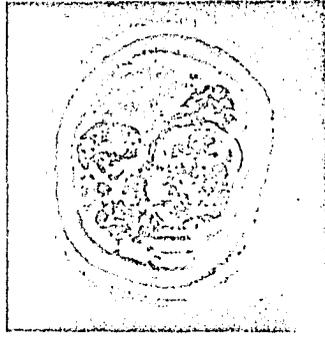
5



6



7



8

LAMINA XIV : Variaciones morfológicas del estadio de blastocisto, obtenidos en la mañana del quinto día de gestación.

1 a 6) Diversas etapas en la formación del espacio blastocélico.

7) Blastocisto expandido con un blastómero no integrado en forma de vesícula.

8) Blastocisto expandido.

LAMINA XIV  
100  $\mu$ m



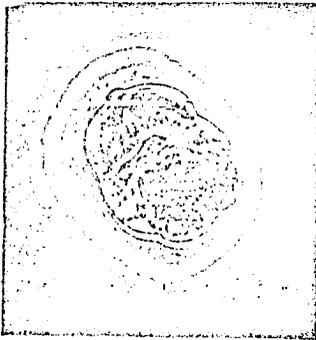
1



2



3



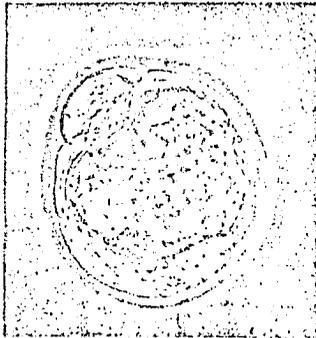
4



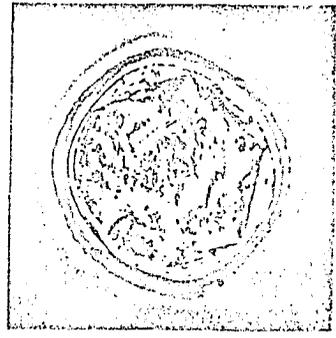
5



6



7



8

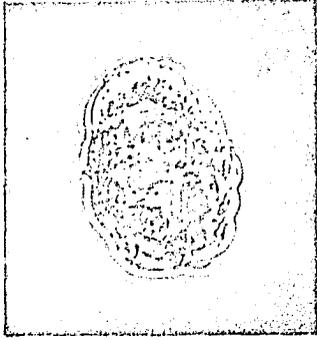
LAMINA XV : Variaciones morfológicas del estadio de blastocisto elongado, obtenidos en la tarde del quinto y mañana del sexto día de gestación.

1 y 2) Blastocistos elongados, obtenidos en la tarde del quinto día de gestación.

3 a 6) Blastocistos elongados, obtenidos en la mañana del sexto día de gestación.

LAMINA XV

100  $\mu$ m



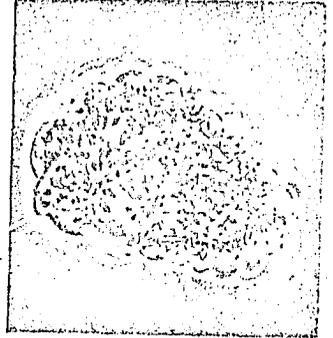
1



2



3



4



5



LAMINA XVI : Embriones degenerados, obtenidos entre el primero y el quinto día de gestación.

1 a 8) Zonas pelúcidas que contienen en su interior diferentes cantidades de material embrionario disuelto.

LAMINA XVI

100  $\mu$ m



1



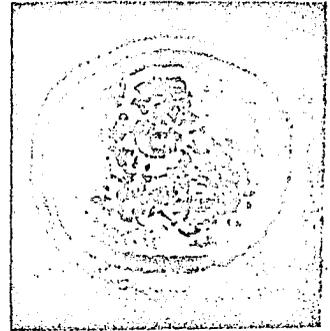
2



3



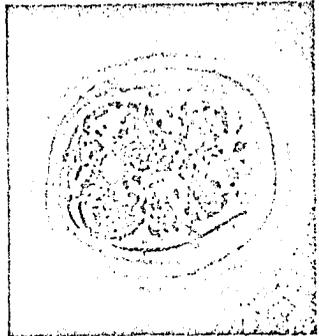
4



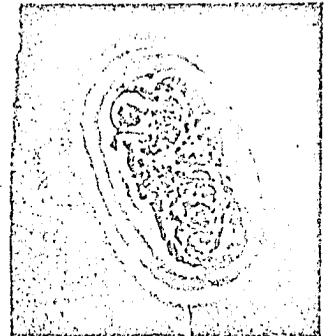
5



6



7



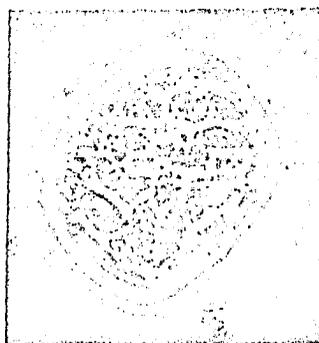
8

LAMINA XVII : Embriones degenerados, obtenidos entre el primero y el quinto día de gestación.

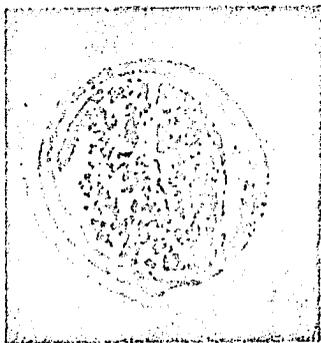
1 a 8) Zonas pelúcidas que contienen en su interior diferentes cantidades de material embrionario disuelto.

LAMINA XVII

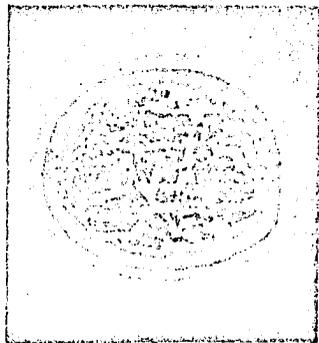
100  $\mu$ m



1



2



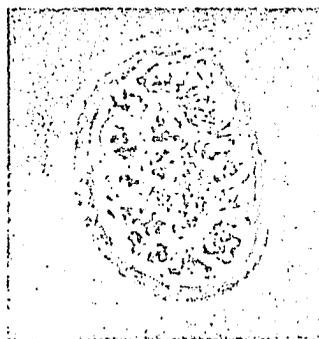
3



4



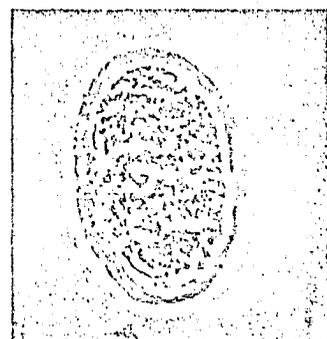
5



6



7



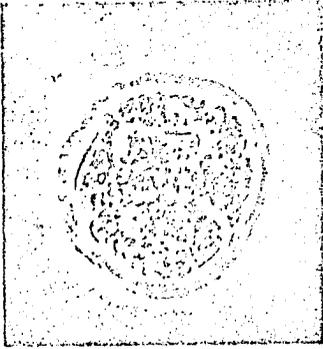
8

LAMINA XVIII : Embriones degenerados, obtenidos entre el primero y el quinto día de gestación.

- 1) Zona pelúcida con material embrionario disuelto en su interior.
  
- 2 a 7) Embriones degenerados de diversa morfología y con blastómeros no integrados.

LAMINA XVIII

100  $\mu$ m



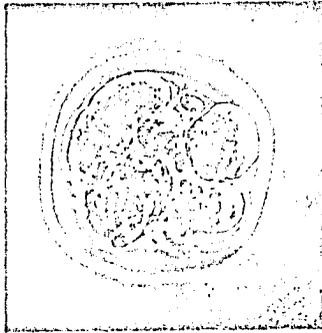
1



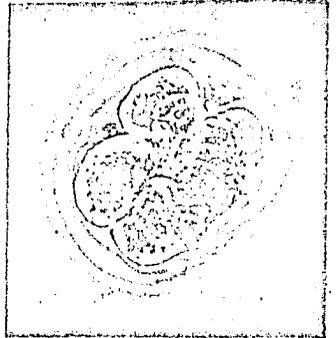
2



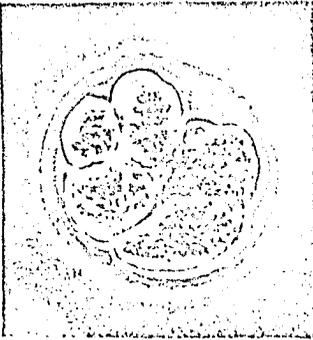
3



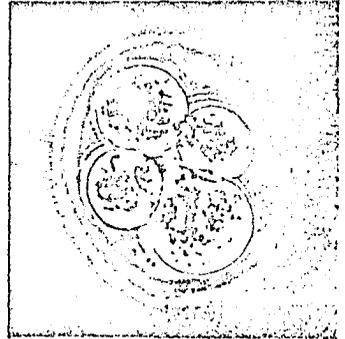
4



5



6

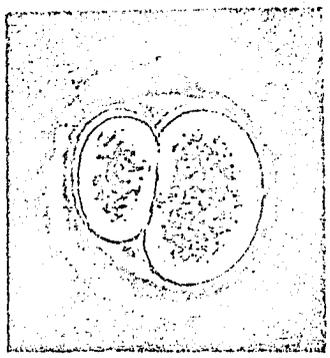


7

LAMINA XIX : Ovocitos no fertilizados y fragmentados, obtenidos entre el primero y el quinto día de gestación.

1 a 9) Ovocitos con diferentes grados de fragmentación.

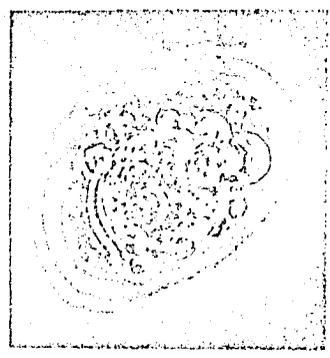
LAMINA XIX  
100  $\mu$ m



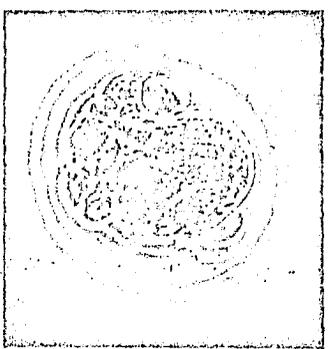
1



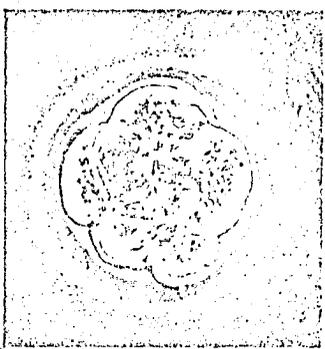
2



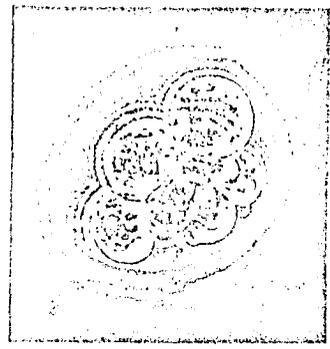
3



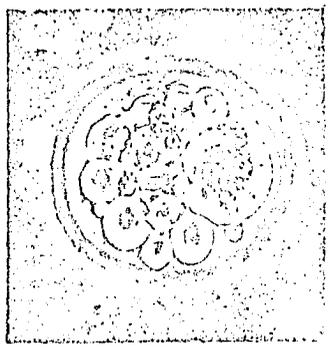
4



5



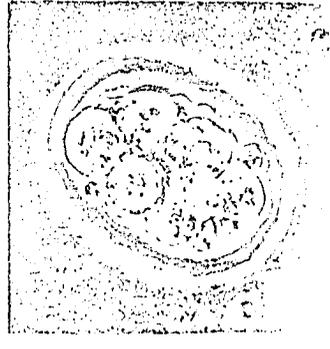
6



7



8

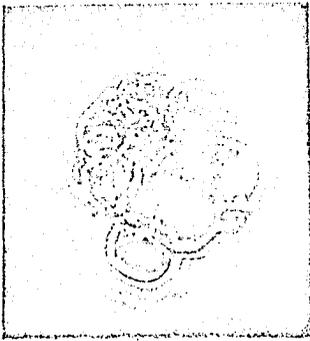


9

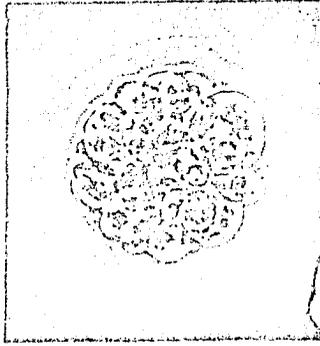
LAMINA XX : Ovocitos no fertilizados y fragmentados, obtenidos entre el primero y el quinto día de gestación.

1 a 9) Ovocitos con diferentes grados de fragmentación.

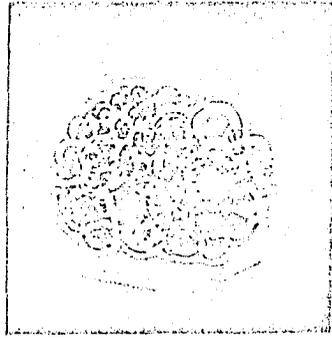
LAMINA XX  
100  $\mu$ m



1



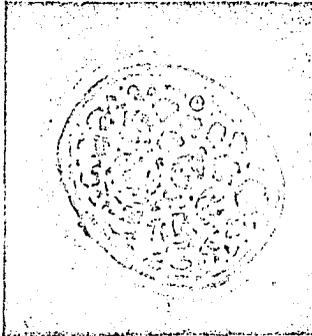
2



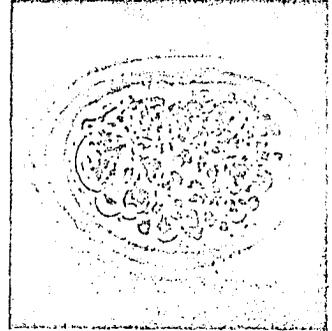
3



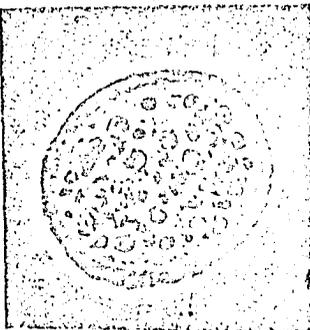
4



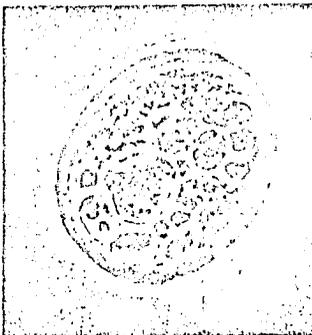
5



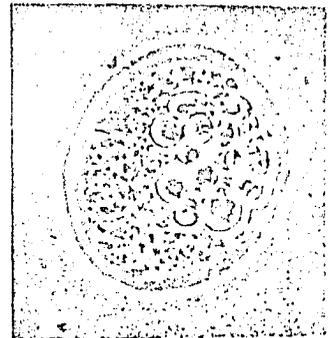
6



7



8



9

Tomando en consideración la secuencia fotográfica anterior, los estadios de preimplantación embrionaria que poseen características morfológicas normales y que podrían ser transferibles a hembras pseudogestantes son los siguientes:

Embriones de una célula: fotografías de la 1 a la 4 de la lámina III.

Embriones de dos células: fotografías de la 1 a la 5 de la lámina IV.

Embriones de tres células: fotografías de la 1 a la 3 de la lámina VI.

Embriones de cuatro células: fotografía 1 de la lámina VIII.

Embriones de ocho células: fotografías de la 1 a la 7 de la lámina IX, y fotografía 1 de la lámina X.

Embriones en el estadio de mórula: fotografías de la 1 a la 5 de la lámina XI.

Embriones en el estadio de blastocisto: fotografías de la 1 a la 8 de la lámina XIV.

Embriones en el estadio de blastocisto elongado: fotografías de la 1 a la 6 de la lámina XV.

A lo largo del estudio morfológico, se encontró que aproximadamente el 20% de los embriones que una hembra produce sufren de algún tipo de anomalía morfológica, como por ejemplo: degeneramiento, blastómeros no integrados o disueltos, detritos celulares en el espacio perivitelino y fragmentación.

Así mismo, estas alteraciones morfológicas anteriores se incrementaron hasta un 80% durante el invierno.

#### B) Resultados del Estudio de Microcirugía.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos tanto in vitro como in vivo a que fueron sujetos los embriones (ver Láminas A y B).

##### 1) Cultivo in vitro de embriones.

De 50 embriones en los estadios de mórula y blastocisto temprano que fueron cultivados en medio de Eagle por un lapso de 24-48 horas, se desarrollaron en blastocistos 43 (86%) embriones. Sin embargo, cuando a las mórulas y blastocistos tempranos se les eliminó su zona pelúcida, 41 (82%) se desarrollaron.

Al comparar ambos resultados anteriores, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.55$ ).

## 2) Cultivo in vivo de embriones.

De 100 embriones en el estadio de mórula que se transfirieron a 10 hembras pseudogestantes, se recuperaron 24 horas después 91 embriones, los cuales habían progresado a la etapa de blastocisto. Sin embargo, cuando se volvió a desarrollar el procedimiento anterior, pero con embriones a los que se les había eliminado la zona pelúcida, no se logró la recuperación de ninguno. Por lo tanto, existe una diferencia altamente significativa en el desarrollo de los embriones en el estadio de mórula, determinada por la presencia o ausencia de la zona pelúcida ( $P < 0.001$ ).

No obstante, cuando se transfirieron 52 blastocistos con zona pelúcida y 50 sin esta membrana a hembras pseudogestantes, se obtuvieron 39 (75%) desarrollos fetales con los embriones que en el momento de su transferencia poseían su zona y, 29 (58%) fetos con aquellos a los que se les había eliminado dicha membrana. Al compararse ambos resultados, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.30$ ) a favor de los embriones a los que no se les eliminó su zona pelúcida por medios enzimáticos.

## 3) Cultivo in vitro de hemiembriones.

El procedimiento de microcirugía que se empleó para dividir por la mitad los embriones, daba como resultado hemiembriones

de dos y tres células principalmente (ver lámina A), lo que indica que durante este proceso se pueden dañar uno o varios blastómeros.

Una vez que se obtuvieron los hemiembriones por microcirugía, se cultivaron por un lapso de 24-48 horas en el laboratorio, observándose al final de este período las siguientes formas embrionarias (ver lámina B):

- a) Vesículas trofoblásticas. Estructura embrionaria en donde todas sus células participan en la formación del espacio blastocélico, y no posee masa celular interna.
- b) Mórulas. Estructura formada por agregados celulares que no poseen en su interior cavidad alguna.
- c) Mórulas vesiculadas. Estructura formada por agregados celulares que poseen en su interior una pequeña vesícula de apariencia irregular.

Los porcentajes obtenidos de las diferentes formas embrionarias se encuentran en el cuadro 4.

#### 4) Cultivo in vivo de hemiembriones.

Se transfirieron a 15 hembras pseudogestantes 280 hemiembrion-

CUADRO 4) Formas embrionarias obtenidas después del cultivo in vitro de los hemiembriones.

Forma Embrionaria	Cantidad	Porcentaje
No. de embriones que se dividieron	140 <sup>+</sup>	
No. de hemiembriones cultivados	260	100%
Vesículas trofoblásticas	168.	64.6%
Mórulas	67	25.7%
Mórulas vesiculadas	25	9.6%

<sup>+</sup> Los hemiembriones que durante el procedimiento de microcirugía resultaron dañados completamente, fueron desechados.

nes y 50 vesículas trofoblásticas. Veinte y cuatro horas después de la transferencia, se sacrificaron los animales y no se recuperó ninguno de los embriones introducidos. De igual manera, no se obtuvieron desarrollos fetales cuando el sacrificio se efectuó doce días después.

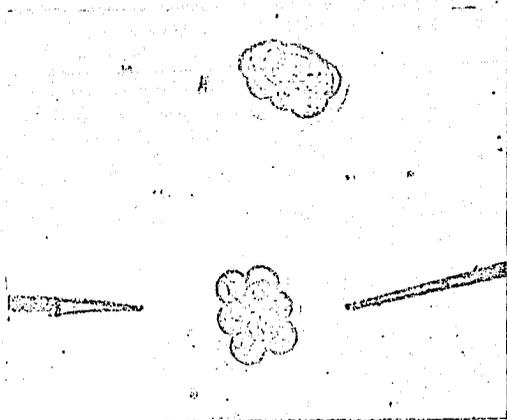
Al comparar los resultados del cultivo in vitro e in vivo de los hemiembriones, se encontró una diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) determinada por el desarrollo de estos métodos.

LAMINA A: Microcirugía de Embriones

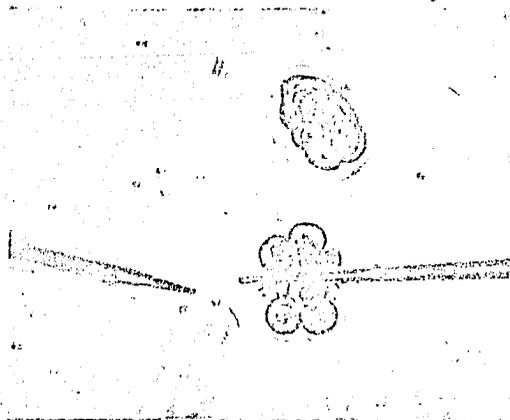
1 a 6) Secuencia fotográfica de la bipartición  
de una mórula de rata.

LAMINA A: MICROCIROGIA DE ENBRIONES

100  $\mu$ m



1



2



3



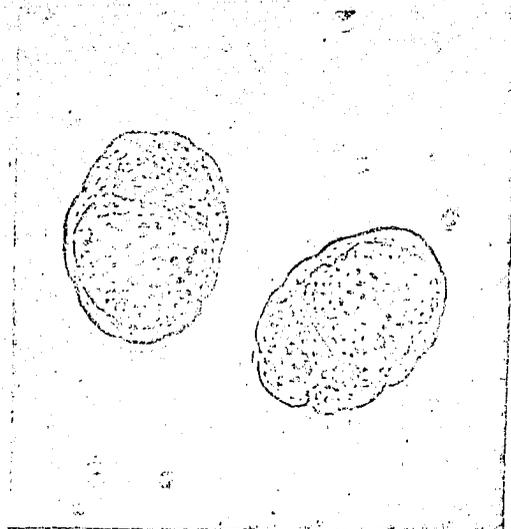
4



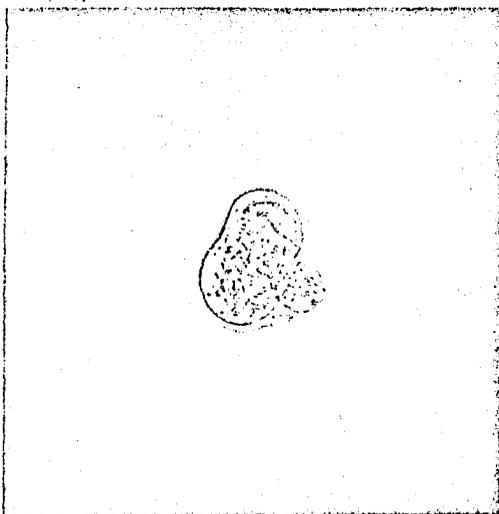
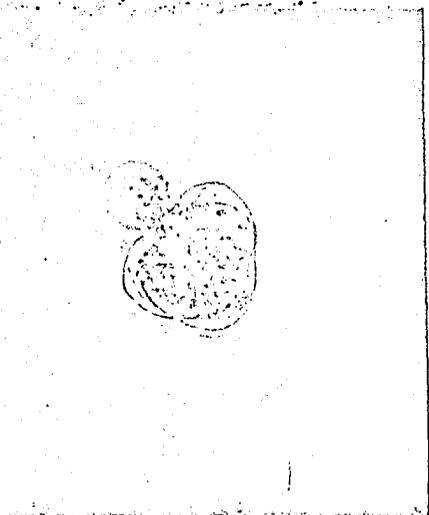
5

LAMINA B: Microcirugía de Embriones

- 1) Blastocistos normales cubiertos con su zona pelúcida.
  
- 2-3) Las vesículas trofoblásticas y las mórulas vesiculadas, son unas de las estructuras resultantes del cultivo in vitro de los embriones partidos por la mitad por medio de la microcirugía.



1) BLASTOCISTOS NORMALES



VESICULA TROFOBLASTICA

3) MORULA VESICULADA

## VI) DISCUSION

### A) Morfología Embrionaria.

En el desarrollo del presente trabajo se observó que los embriones de rata Wistar, sufren de algún tipo de anomalía morfológica en un 20% aproximadamente, lo cual podría ser causa de una falta o retraso en la fertilización de dichos óvulos.

Al comparar estas malformaciones con las descritas por otros autores ( 6,7,9 ) para diversas especies, se ha observado que tales anomalías pueden ser similares a las que se presentan en la rata.

De todas las malformaciones que se registraron, sería difícil identificar cual de ellas impediría el desarrollo futuro de un embrión; ya que estas variaciones estructurales podrían "corregirse" durante el desarrollo embrionario.

Esto último se deduce por el hecho de que aproximadamente el 90% de las anomalías morfológicas embrionarias se presentan antes del estadio de blastocisto, como se observa en las láminas fotográficas de la III a la XIII.

Shea y col. (32), comentan que aún los embriones clasificados

como morfológicamente "malos" son capaces en ciertas ocasiones de implantarse y dar origen a fetos, por lo que la gestación de un animal no depende solamente de la condición del embrión sino también de la calidad de la receptora.

Uno de los factores morfológicos que no afecta la viabilidad de los embriones, es la presencia de restos celulares adosados a su zona pelúcida. Sin embargo, si existe una infección en el aparato reproductor del animal, los detritos celulares que rodcan al embrión se incrementan, por lo que su viabilidad puede verse disminuida.

Los embriones degenerados que se encuentran expuestos en las láminas XVI, XVII y XVIII, presentan alteraciones morfológicas severas lo que podría impedir su desarrollo futuro. Las causas de estos fenómenos degenerativos son desconocidos.

Las fragmentaciones en el citoplasma de los ovocitos de las láminas XIX y XX, se debió a que no fueron fertilizados. Estos ovocitos en algunas ocasiones adquieren formas de embriones en desarrollo, como es el caso del ovocito de la fotografía 1 de la lámina XIX.

Sin embargo, es posible discernir entre una forma y otra, ya que los ovocitos fragmentados poseen grán número de vesículas, las cuales son de diversos tamaños y no poseen núcleo.

Durante el período de invierno, se ha encontrado que el por-

centaje de embriones que sufren de alguna alteración se incrementa considerablemente llegando en algunas ocasiones hasta el 80% o más. Este aumento en las malformaciones debidas a la temperatura ha sido observada igualmente por Hunter (13) y Hafez (6).

Lo anterior podría ser debido a una respuesta adaptativa de los animales hacia el medio ambiente adverso.

Analizando la secuencia fotográfica, se podrá notar que las etapas de ocho células y mórula, poseen en su conjunto la mayor variedad de alteraciones morfológicas lo cual puede ser debido a que en estos animales, estos dos estadios se desarrollan sin un incremento celular.

#### B) Microcirugía Embrionaria.

De los resultados obtenidos en la microcirugía de los embriones se observa lo siguiente:

1) La ausencia de la zona pelúcida en embriones normales o hemiembriones cultivados in vitro no interfiere con su desarrollo posterior. Lo cual puede ser debido a que bajo estas condiciones de laboratorio, los embriones no requieren la protección que esta membrana normalmente les brinda.

Sin embargo, cuando se transfirieron a hembras pseudogestantes

mórulas o hemiembriones sin zona pelúcida, estos no se desarrollaron en fetos, así como tampoco fue posible recuperarlos 24 horas después de que fueron transferidos, debido probablemente a que fueron fagositados por leucocitos presentes en el lumen uterino, o por su posible implantación y no desarrollo en el útero, ya que ocasionalmente se observaron reacciones deciduales vacías.

Por lo tanto, parece ser que la zona pelúcida es indispensable para garantizar el desarrollo in vivo de los embriones por lo menos hasta el estadio de mórula, ya que cuando se transfirieron blastocistos con y sin zona pelúcida, estos se desarrollaron en fetos. Esto último es de esperarse ya que esta etapa embrionaria se encuentra bajo estas dos condiciones de manera natural.

Las observaciones anteriores se encuentran apoyadas por los trabajos de Modlinski (22) y Bronson et al (3), quienes han estudiado las diversas funciones que la zona pelúcida desempeña.

2) El cultivo en el laboratorio de los hemiembriones, dió como resultado el desarrollo de vesículas trofoblásticas y mórulas vesiculadas principalmente. Las primeras, se encontraron formadas por cuatro células, las cuales formaron entre ellas una cavidad llena de líquido blastocólico, sin embargo, no poseen

masa celular interna.

Las mórulas vesiculadas a diferencia de la forma anterior, son más pequeñas y la cavidad que desarrollaron, se formó en el interior de uno de los blastómeros y no entre estos (ver lámina B).

Ninguna de las formas embrionarias anteriores se puede considerar como normal, ya que no cuentan con las células de la masa celular interna y trofoblásticas en el mismo embrión. Lo anterior explica la falta de desarrollos fetales cuando fue ron transferidos estos hemiembriones a hembras receptoras.

La explicación al desarrollo anormal de los hemiembriones cuando fueron cultivados en el laboratorio es la siguiente:

Se ha observado que durante el desarrollo embrionario en la rata, el estadio de blastocisto comienza a formarse de manera natural cuando el embrión posee de 8 a 16 células. sin embargo, Tarkowsky (36) ha encontrado que bajo condiciones de laboratorio este proceso se puede adelantar.

De esta manera, si seccionamos por la mitad un embrión de ocho células de rata y cultivamos in vitro los hemiembriones resultantes, estos tenderán a crear una cavidad en su interior casi inmediatamente, ya que la formación del estadio de blastocisto comenzará al mismo tiempo en estos como en el embrión intacto.

Así, la falta de células y de un microambiente en el interior de los hemiebriones impedirá el desarrollo de su masa celular interna, por lo que tenderán a formar vesículas trofoblásticas y mórulas vesiculadas.

Rossant (28) ha encontrado que se requiere de un mínimo de células de la masa celular interna, para que se lleve a cabo la implantación normal de un embrión. Ya que de lo contrario, Gardner (4) ha observado que estos embriones anormales al no poseer este tipo de células, se vuelven incapaces de progresar in vivo.

Por lo tanto, si se realiza la formación de hemiebriones a partir de estadios avanzados en la rata, se incrementará la posibilidad de obtener vesículas trofoblásticas y no blastocistos normales.

Hahn (11) comenta que los embriones de rata a diferencia de los de bovino, no poseen mucha resistencia hacia el traumatismo mecánico de la bipartición, lo cual se refleja en los escasos resultados obtenidos en esta especie por otros autores.

Tomando en consideración las observaciones anteriores, es posible que la técnica de microcirugía desarrollada en el presente trabajo pueda dar como resultado fetos en desarrollo, si se lleva a cabo en embriones que posean mayor número celular en el estadio de mórula.

## VII) CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir:

- 1) Los embriones producidos por una rata Wistar sufren de alguna anomalía morfológica en una proporción del 20% aproximadamente.
- 2) Las anomalías morfológicas embrionarias se incrementan durante el invierno hasta un 80% o más.
- 3) La viabilidad de los embriones que sufren de alguna alteración morfológica, solo puede ser probada cultivando al embrión en el laboratorio o transfiriéndolo al interior de una hembra receptora.
- 4) Los estadios de preimplantación embrionaria en la rata, son muy semejantes a los observados en el ratón y hamster.
- 5) La división mecánica de embriones de rata en el estadio de mórula o blastocisto temprano, no permite el desarrollo de blastocistos normales después de que los hemiembriones han sido cultivados en el laboratorio.
- 6) La presencia de la zona pelúcida es indispensable para asegurar el desarrollo in vivo de un embrión y hemiembrión de rata.

VIII) BIBLIOGRAFIA

- 1) Betteridge, K.J., Eaglesome, W.D., Randall, G.C.B. and Mitchell, D.: Collection, description and transfer of embryos from cattle 10 - 16 days after oestrus. J. Reprod. Fertil. 59: 205-216 (1980).
- 2) Brinster, R.L.: Embryo development. J. Anim. Sci. 38: 1003-1012 (1974).
- 3) Bronson, R.A. and McLaren, A.: Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. J. Reprod. Fertil. 22: 129-137 (1970).
- 4) Gardner, R.L.: An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. J. Embryol. Exp. Morph. 28: 279-312 (1972).
- 5) Granholm, H.H. and Brenner, G.M.: Effects of Cytochalasin B (CB) on the morula to blastocyst transformation and trophoblast out growth in the early mouse embryo. Exptl. Cell. Res. 101: 143-153 (1976).
- 6) Hafez, E.S.E.: Procedures and problems of manipulation, selection, storage and transfer of mammalian ova. Cornell Vet. 51: 299-333 (1961).

- 7) Hafez, E.S.E.: In vitro and in vivo survival of morphologically atypical embryos in rabbits. Nature 196: 1226-1227 (1962).
- 8) Hafez, E.S.E.: Structural and development anomalies of rabbit ova. Intern. J. Fertil. 6: 394-407.
- 9) Hafez, E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Edited by: Lea & Febiger, Philadelphia (1970).
- 10) Hafez, E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Edited by: Lea & Febiger, Philadelphia (1974).
- 11) Hahn, J.: The value of laboratory animal models in embryo-transfer research. Theriogenology 21: 45-59 (1984).
- 12) Houillón, G.: Sexualidad. Editado por: Omega, España (1974).
- 13) Hunter, R.H.F.: Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos. Editado por: AGRIBIA, España (1982).
- 14) Johnson, M.H.: Effect of prolonged decompaction on the development of the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morph. 54: 241-261 (1979).

- 15) Kelly, S.J.: Studies of the developmental potential of 4- and 8- cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. 200: 365-376 (1977).
- 16) Lambeth, V.A.: Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twin calves. Theriogenology 20: 85-95 (1983).
- 17) Lehn - Jensen, H. and Willadsen, S.W.: Deep - Freezing of cow "half" and "quarter" embryos. Theriogenology 19: 49-54 (1983).
- 18) Linder, G.M. and Wright, R.W.: Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20: 407-416 (1983).
- 19) Massey, J.M., Anderson, J.G., Ellis, E.C., Sorensen, A.M. and Kraemer, D.C.: Development of bovine embryos following enzymatic removal of the zona pellucida. Theriogenology 17: 99 (1982).
- 20) Massip, A. and Kulnard, J.: Time - lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen - thawed cow blastocysts. J. Reprod. Fertil. 58: 475 (1980).
- 21) Mintz, B.: Methods in developmental biology. Edited by: Thomas V. Crowel, New York (1967).
- 22) Modlinski, J.A.: The role of the zona pellucida in the

development of mouse eggs in vivo. J. Embryol. Exp. Morph. 23: 539-547 (1970).

- 23) Moore, N.W., Adams, C.E. and Rowson, L.E.A.: Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. J. Reprod. Fertil. 17: 527-531 (1968).
- 24) Nicholas, J.S. and Hall, B.V.: Experiments on developing rats. J. Exp. Zool. 90: 441-459 (1942).
- 25) O'Brien, M.J., Critser, E.S. and First, N.L.: Developmental potential of isolated blastomeres from early murine embryos. Theriogenology 19: 143 (1983).
- 26) Renard, J.P., Menzo, Y. and Heyman, Y.: Alternative tests to assess the viability of bovine embryos. Theriogenology 17: 106 (1982).
- 27) Renard, J.P., Philippon, A. and Menzo, Y.: In vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. J. Reprod. Fertil. 58: 161-164 (1980).
- 28) Rossant, J.: Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8- cell mouse eggs. J. Embryol. Exp. Morph. 36: 283-290 (1976).
- 29) Rugh, R.: Vertebrate embryology. The dynamics of development. Edited by: Brace & World Inc., New York (1964).

- 30) Schilling, E., Smidt, D., Sacher, D., Petacand, D. and El Kaschab, S.: Diagnosis of the viability of early bovine embryos by fluorescence microscopy. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 1625 (1979).
- 31) Seidel, G.E.: Potential applications of cloning in animal industry. En: Memorias del Noveno Congreso Internacional sobre Reproducción e Inseminación Animal. Madrid, España (1980).
- 32) Shea, B.P.: Evaluating the bovine embryo. Theriogenology 15: 31-35 (1981).
- 33) Smith, R. and McLaren, A.: Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoel. J. Embryol. Exp. Morph. 41: 79-92 (1977).
- 34) Tarkowski, A.K. and Wroblewska, J.: Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8- cell stage. J. Embryol. Exp. Morph. 18: 155-180 (1967).
- 35) Tarkowski, A.K.: Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature 184: 1286 (1959).
- 36) Tarkowski, A.K.: Development of single blastomeres. In "Methods in Mammalian Embryology". Edited by: J.C. Daniel, Jr., W.H. Freeman and Co., San Francisco (1971)

- 37) Trounson, A.G. and Moore, N.W.: The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. J. Reprod. Fertil. 41: 97-105 (1974).
- 38) Trounson, A.O., Willadsen, M. and Rowson, J.E.A.: The influence of cow eggs. J. Reprod. Fertil. 46: 367-370 (1976).
- 39) Willadsen, S.M., Lehn-Jensen, H., Fehilly, C.B. and Newcomb, R.: The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. Theriogenology 15: 23-29 (1981).
- 40) Williams, T.J., Elsdon, R.P. and Seidel, G.E.: Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. Theriogenology 17: 114 (1982).