

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CULTIVO DE EMBRIONES DE RATA EN EL LABORATORIO

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

JOSE RAUL ASTIAZARAN YBARRA

MEXICO, D.F.

1984



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.

CULTIVO DE EMBRIONES DE RATA EN EL LABORATORIO.

INDICE:

	Página
I) RESUMEN	1
II) INTRODUCCION	3
A) Desarrollo Embrionario	3
1) Formación de Blastocisto	5
B) Cultivo de Embriones en el Laboratorio	8
1) Composición Iónica	9
2) Requerimientos Energéticos	11
3) Requerimientos Protéicos	12
4) Requerimientos Nitroge- nados	15
III) MATERIALES Y METODOS	18
A) Obtención de Embriones	18
B) Medios de Cultivo	19
C) Sistemas de Cultivo	20
D) Desarrollo Embrionario	21
IV) RESULTADOS Y DISCUSION	23
A) Cultivo en líquido uterino	24
B) Cultivo en suero de rata	25
C) Cultivo en solución salina con base en Earle modifica- da	26
D) Cultivo en solución salina con base en Earle modificada	

	Página
y suplementada	26
E) Cultivo en solución o medio de Eagle modificado y en uno suplementado	27
V) CONCLUSIONES	29
VI) REFERENCIAS	30

I) RESUMEN

Una de las etapas esenciales en el estudio del desarrollo de los mamíferos in vitro es la de establecer una técnica, adecuada para el cultivo embrionario fuera del organismo materno.

El propósito del presente trabajo fué la de comparar diversos medios de cultivo para poder determinar cual o cuales son los más apropiados para el desarrollo en el laboratorio de los embriones de rata Wistar en la etapa de 8 células, ya que el cultivo de las últimas etapas de la preimplantación embrionaria es indispensable para los estudios de transferencia y manipulación de embriones.

Los medios estudiados son: a) Líquido uterino (LU), b) Suero de rata (SR), c) Medio basal de Eagle modificado (MEE), d) Medio basal de Eagle modificado y suplementado (MBES), e) Solución salina con base en Earle modificada (SSE) y, f) Solución salina con base en Earle modificada y suplementada (SSES).

Fueron cultivados un total de cincuenta embriones en la etapa de 8 células en cada uno de los medios escogidos. En el transcurso de 24 horas de cultivo, los embriones se desarrollaron en blastocistos, obteniéndose los siguientes resultados: LU, 0 %; SR, 0 %; MEE, 73.7 %; MBES, 61.7 %; SSE, 0 % y SSES, 64.3 %.

De lo anterior se deduce que solamente una solución salina fisiológica puede ser utilizada como medio de cultivo para

los embriones de rata, siempre y cuando se encuentre convenientemente suplementada con los nutrientes apropiados.

II) INTRODUCCION

El cultivo de los embriones de mamífero fuera del ambiente materno durante las etapas de preimplantación, constituye una herramienta muy importante para conocer los factores necesarios del desarrollo embrionario.

Alrededor de los últimos cincuenta años se han logrado grandes avances en esta área, gracias a los conocimientos establecidos ya en las técnicas de cultivo de tejidos; sin embargo, no se han obtenido grandes logros en el cultivo y desarrollo en el laboratorio 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 línea celular (35).

A) Desarrollo Embrionario.

Momentos después de que la fecundación del ovocito se lleva a cabo a la altura del primer tercio del oviducto, el embrión comienza a descender hacia la región uterina. Durante este trayecto el embrión sufre una serie de divisiones mitóticas llamadas segmentaciones, las cuales son relativamente lentas y dan progresivamente como resultado células llamadas blastómeros de menor tamaño (28).

Las células o blastómeros que conforman a un embrión, conforme se van dividiendo no incrementan su volumen citoplasmático que es lo que generalmente se observa en otras estirpes.

Un aspecto importante de esta reducción citoplasmática, es el hecho de que la relación nucleo-citoplasma va de pequeña a normal lo cual es importante para la regulación de la actividad genética del embrión (12).

Las divisiones celulares en el embrión suelen ser sincrónicas por lo menos hasta el estadio de 8 células, a partir del cual es posible encontrar en el interior de la zona pelúcida cualquier número de blastómeros (20).

Al principio del desarrollo embrionario, los blastómeros poseen una forma esférica o redondeada cubierta por la zona pelúcida, la cuál es una membrana que cubre y protege al embrión. Sin embargo conforme va aumentando el número de células, estas van adquiriendo una nueva apariencia, como resultado de la compactación que se comienza a desarrollar. Este proceso es independiente de la presión que ejerce la zona pelúcida sobre todo el embrión (20).

Algunos autores consideran que el estadio de mórula, es cuando el embrión posee en su interior aproximadamente unas 32 células o más, sin observarse aún ninguna cavidad o espacio en su interior. Sin embargo en la mayoría de las especies es difícil cuantificar la cantidad de células que conforman a un embrión después de la etapa de 8 células, mas aún, en especies que desarrollan blastocistos pequeños, como es el caso del ratón, rata y hamster, se ha observado que el inicio de la cavidad o espacio blastocélico comienza a desarrollarse en embriones que poseen menos de 16 células; por lo que es más conveniente denominar al estado de mórula como aquella

etapa en que un embrión posee más de 8 células sin contener en su interior espacio alguno (12 20 29).

1) Formación de Blastocisto.

Quando la segmentación del embrión da comienzo, existe un espacio pequeño entre la zona pelúcida y el embrión el cuál se denomina espacio perivitelino. Durante las primeras o más divisiones cualquier espacio que se desarrolle entre los blastómeros pasa al espacio anterior. No es sino hasta que una pequeña abertura comienza a delimitarse en el interior del embrión cuando se considera que la formación de la etapa de blastocisto se ha iniciado (12).

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

Los primeros signos de compactación entre las células del embrión se presentan durante la etapa de 8 células en el embrión de rata, sin embargo, en la mayoría de los demás mamíferos, el estadio de blastocisto temprano se desarrolla cuando en embrión posee una mayor cantidad de células (12).

Existen diversas opiniones con respecto al proceso de formación del espacio blastocélico, Tarkowski y Wroblewska (30) escriben que la secreción del líquido blastocélico parece ser una actividad citoplasmática de la célula que ésta de-

carrolla después de un cierto período definido de tiempo y, es además independiente del número de divisiones celulares.

Otros autores parecen estar de acuerdo con la idea anterior, como por ejemplo Dicibella y Anderson (15) quienes opinan que la formación del blastocele parece ser un evento programado en el tiempo y no en el número celular que compone al embrión.

Granholm y Brenner (17) sugieren que en la regulación de los procesos morfogénéticos embrionarios en el ratón, la cronología parece ser más importante que el número 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 y las células del trofoblasto.

Copp (14) hace una distinción en las células trofoblásticas ya que las divide en polares y murales. Las primeras son aquellas que se encuentran sobre las células de la masa celular interna y las segundas son las que se localizan rodeando al espacio blastocélico.

Las divisiones celulares en el interior del blastocisto no son sincrónicas, ya que las células del trofoblasto se caracterizan por poseer un índice mitótico más elevado que las células de la masa celular interna. De esta manera un embrión de ratón que posea por ejemplo 32 células, sólo 3 ó 4 pertenecerán a la masa celular interna y el resto a las

células del trofoblasto (12).

En los marsupiales existe una excepción al arreglo celular anterior, ya que los embriones no poseen masa celular interna, probablemente las células embrionarias se encuentran formando parte de una capa celular que no se puede distinguir de las células trofoblásticas sino hasta una etapa muy avanzada (20).

Una característica muy importante que se presenta con la formación de la cavidad del blastocisto, es la facultad del embrión de acumular líquidos en su interior. Analizando la composición de estos líquidos, Borland y col. (3) han encontrado la presencia de diversos iones como son: Na, Cl, K, Ca, Mg, S y P.

El proceso de acumulación de sustancias en el embrión, probablemente se desarrolla al mismo tiempo en que se diferencian las células de la masa celular interna de las trofoblásticas, además, este proceso podría ser asociado con el fenómeno de diferenciación celular (25), aunque esto último no ha sido demostrado.

La capacidad del embrión en acumular líquidos en su interior se encuentra asociada principalmente a dos funciones o procesos celulares, la permeabilidad selectiva y el transporte de sustancias (3).

Una vez que se haya terminado el proceso de formación del

blastocelo, el embrión se "libera" de la zona pelúcida y da inicio a la etapa de implantación en el epitelio uterino. El tiempo aproximado que dura la gestación en ratas es de 21 días.

E) Cultivo de Embriones en el Laboratorio.

El cultivo de embriones de mamífero en el laboratorio ha podido llevarse a cabo por lapsos cortos, esto es, los embrines sólo se desarrollan unas cuantas etapas de manera continua fuera del ambiente materno (26).

Esta limitación probablemente refleja el hecho de que el embrión es en general y por definición un sistema cambiante, el cual es dependiente de manera particular de su medio ambiente y por lo tanto, sus características metabólicas así como sus requerimientos exógenos van a estar de manera invariable modificándose continuamente.

Así, tomando en cuenta lo anterior, un medio de cultivo elaborado para embriones debe de suministrar por lo menos algunos de los requerimientos nutricionales para una etapa determinada, así como deben ser estos compatibles con los siguientes estadios embrionarios (26).

Hamond (21) logró desarrollar embriones de ratón de la etapa de 8 células hasta la de blastocisto, empleando como medio de cultivo una combinación de clara y yema de huevo con

sales inorgánicas.

Más recientemente Mintz (26) cultivó embriones de ratón de 2 células y éstos se desarrollaron hasta blastocistos utilizando como medio de cultivo una mezcla de suero fetal de ternera y solución salina balanceada. El pH del medio fué ajustado con una atmósfera de bióxido de carbono y aire.

El primer medio de cultivo definido elaborado para el desarrollo in vitro de embriones de mamífero fué diseñado por Whitten en 1956 (32), y con el cual se pudo lograr el crecimiento de embriones de 8 células de ratón. Posteriormente McLaren y Biggers (24) utilizando los embriones desarrollados con el medio anterior los transfirieron a hembras receptoras logrando el nacimiento de crias normales.

1) Composición Iónica.

En estudios realizados por diversos autores (18 31) se ha observado que no existe un desarrollo embrionario in vitro cuando el ión bicarbonato se vé omitido del medio de cultivo. Así mismo, los embriones de ratón se desarrollan un poco cuando el medio en que se encuentran no está amortiguado por el sistema bicarbonato - CO₂ (6 11).

Recientemente se ha encontrado la incorporación de carbón a partir de bióxido de carbono radiactivo y bicarbonato en todas las etapas de la preimplantación embrionaria (18 31),

lo cuál permite inferir que parte del bióxido de carbono es fijado por medio de la combinación con el piruvato para, de esta manera, producir oxaloacetato.

Sin embargo, lo anterior no significa que sea la función más importante del bióxido de carbono, ya que se ha visto que los medios de cultivo que contengan oxaloacetato y no bióxido de carbono no permiten el desarrollo embrionario (35).

La presencia de una alta concentración de bicarbonato y bióxido de carbono a lo largo del oviducto y del útero de la hembra, así como también en el líquido blastocélico del embrión, puede considerarse como una prueba de la importancia del bióxido de carbono para el desarrollo embrionario (35).

El ión hidrógeno es uno de los más importantes en el medio de cultivo, y su concentración se encuentra regulada en todas aquellas soluciones que posean bicarbonato, por medio de la interacción entre los niveles de bióxido de carbono atmosférico y la concentración del bicarbonato del medio.

Whitten (32) ha desarrollado embriones de ratón de 8 células dentro de una gama de pH de 6.9 a 7.7, así mismo, Brinster (6) obtuvo el crecimiento de embriones de 2 células en la gama de pH de 5.87 a 7.78.

Es difícil determinar el efecto de la concentración de los

iones hidrógeno sobre el desarrollo embrionario debido a su dependencia con las fuentes de energía presentes en el medio (6 7). Sin embargo un medio con un pH de 7.2 a 7.4 y suplementado con la concentración adecuada de energía, puede ser utilizado de manera rutinaria para el cultivo de embriones de mamífero en el laboratorio (5 8).

2) Requerimientos Energéticos.

Los requerimientos energéticos de los embriones de mamífero cultivados in vitro han sido ampliamente estudiados por diversos autores (2 4 22 24).

Se ha encontrado que para cada una de las etapas del desarrollo embrionario se necesitan diversas fuentes específicas de energía.

De esta manera el desarrollo in vitro de embriones de una célula sólo es permitido cuando el medio de cultivo se ve enriquecido ya sea con oxaloacetato o con piruvato (9), para el progreso de los embriones de 2 células el medio debe de encontrarse suplementado con lactato, oxaloacetato, piruvato o fosfofenolpiruvato (7 8).

Los estudios sobre desarrollo embrionario después del estadio de 8 células, han revelado que los embriones pueden metabolizar además de los compuestos arriba mencionados gluco

sa, α -Cetoglutarato y malato.

A pesar de la gran importancia del piruvato como principal fuente de energía para el embrión durante sus primeros tres días de desarrollo, la glucosa ha sido considerada como un sustrato clave. Inicialmente existe una pequeña oxidación de la glucosa en piruvato en los embriones de ratón, la cuál se ve ligeramente incrementada en los de conejo. Sin embargo, conforme las divisiones celulares en el embrión van progresando, la utilización de la glucosa se va incrementando de una manera importante hasta llegar el momento de la implantación, cuando el consumo de este azúcar es de igual medida que la del piruvato (9 10).

3) Requerimientos Protéicos.

La mayoría de las células animales requieren de la presencia de proteínas en el medio de cultivo, las cuales son generalmente suministradas por la adición de un suero ya sea completo o dializado (36).

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 (1).

Una de las principales funciones del suero es la de proveer

cierto tipo de hormonas las cuales van a estimular el crecimiento celular. De esta manera es posible sustituir estas funciones por medio de la adición de ciertas hormonas adecuadas.

Otra de las características del suero es la de proveer sitios protéicos de unión los cuales reconocen tanto a vitaminas, lípidos y algunas hormonas. Estos sitios pueden estabilizar y modular la acción de algunas sustancias a las cuales se unen y en algunos casos pueden además actuar desintoxicando el medio captando iones metálicos.

Cuando el suero se omite de un medio de cultivo, se deben encontrar substitutos para todas las funciones importantes anteriormente mencionadas (1).

Fishel (16) ha encontrado un incremento en la incorporación de la uridina tritiada en embriones de 8 células de ratón cultivados en presencia de suero fetal de ternera, este incremento se presenta en el momento en que existen grandes cambios morfológicos dentro del embrión.

El significado del incremento de la síntesis de ARN en el blastocisto temprano cuando es cultivado en presencia de

suero, podría asociarse con los cambios funcionales en los sistemas de transporte de membrana así como con otras propiedades de la superficie celular. Esto podría indicar que los embriones de ratón en sus etapas tardías de preimplantación responden a los factores ambientales y en este caso particular al suero.

Así mismo, se ha encontrado que la etapa de blastocisto se ve estimulada por el suero. Este incremento en las respuestas embrionarias hacia su medio ambiente puede ser una característica importante del control metabólico del blastocisto al momento de la implantación.

El suero es indispensable para el crecimiento de los embriones del estadio de blástula al de blastocisto. De hecho Konwinski (23) 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 las 96 horas de cultivo, que corresponde a la etapa de blastocisto debido a que se presenta el momento de la implantación de este en la mucosa uterina (27).

Al emplear el suero de coneja solamente como único medio de cultivo para embriones de la misma especie, Purshottam (27) observó que estos se desarrollaban bien a partir del estado de 8 células al de blastocisto.

4) Requerimientos Nitrogenados.

Whitten (32) en 1956 encontró que los embriones de ratón podían desarrollarse en medios de cultivo definidos, lo cual indujo a casi todos los estudios posteriores comenzar a emplear este tipo de medios.

Se ha observado que un medio de cultivo compuesto de una solución salina suplementada con albúmina, permite el desarrollo de los embriones de ratón mientras que la solución sin suplementar no lo hace (36).

Whitten (33) encontró que la glicina es un aminoácido necesario así como la glucosa para el desarrollo de los embriones de 8 células de ratón.

La adición de albúmina sérica bovina o sus aminoácidos constituyentes al medio de cultivo son indispensables para

el desarrollo de embriones en la etapa de 2 células (7). Sin embargo, Cholewa y Whitten (13) han demostrado que un embrión de 2 células de ratón puede desarrollarse hasta el estadio de blastocisto en un medio de cultivo que carezca de cualquier fuente de nitrógeno.

No obstante, cuando a estos embriones cultivados en ausencia de fuentes de nitrógeno se les eliminaba su zona pelúcida previamente al cultivo, el porcentaje de desarrollo embrionario se veía sumamente reducido, lo cual hace pensar en la posibilidad de que el embrión obtenga la fuente de nitrógeno a partir de su zona pelúcida, de espermatozoides degenerados encontrados en su interior en el espacio perivitelino, de corpúsculos polares o de algún otro tipo de resto celular (13).

Actualmente se ha establecido, que las fuentes de nitrógeno son necesarias para el desarrollo de embriones de 1 célula (13), sin embargo esto no significa que dichas fuentes sean indispensables para el resto de las etapas embrionarias.

Whitten (35) ha observado que la adición de aminoácidos, péptidos o albúmina sérica bovina a un medio de cultivo

que contuviera niveles tóxicos de iones metálicos ayudaba al desarrollo embrionario (13 19).

Lo anterior fue confirmado por Bunim (35) cuando con éxito substituyó el verceno por glicina en el medio de cultivo, observando que este aminoácido funcionaba como un quelador de iones metálicos, tales como el cobre y el zinc, los cuales son tóxicos para el desarrollo embrionario.

Gwatkin (13) comenta que los aminoácidos requeridos para el desarrollo de los embriones tanto de conejo como de hamster son una necesidad real de nutrición de estos y no para una simple quelación de iones metálicos del medio, aunque esta última función obviamente favorece al desarrollo de los embriones.

Parece no existir una relación entre los aminoácidos esenciales para los cultivos de células y los aminoácidos esenciales para el desarrollo de los embriones de ratón de 2 células, excepto para el caso del aminoácido cistina (7).

III) MATERIALES Y METODOS

A) Obtención de Embriones.

Los embriones utilizados son de rata Wistar y el estadio embrionario que se probó con los diversos medios de cultivo fue el de 8 células, el cual se obtiene en el cuarto día de embarazo del animal, considerando como día uno el día de la detección del tapón vaginal.

Para la obtención de los embriones se procedió de la siguiente manera. Se sacrifica el animal por medio de una dislocación cervical. Su región ventral se esteriliza 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 completamente el aparato reproductor.

Se disecciona el oviducto junto con una pequeña porción del útero y se sumerge en una solución salina esteril. Para la obtención de los embriones en el estado de 8 células, se perfunde el oviducto en su región fimbria utilizando una aguja del número 27 y pinzas de relojero.

Aproximadamente se requiere de 1 a 2 mililitros de medio

o de solución salina para lograr perfundir completamente el órgano. El líquido de perfusión se colecta en vidrios de reloj para su posterior observación al microscopio.

Todos los embriones colectados y clasificados como morfológicamente normales se lavan por lo menos una vez en medio fresco antes de ser transferidos al medio de cultivo.

Las operaciones de colecta y traslado de embriones se realizan con una pipeta Pasteur cuya punta posee un diámetro aproximado de 150 μ m, con la finalidad de colectar en mínimo medio posible junto con los embriones cuando estos son transferidos.

B) Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo que se probaron fueron los siguientes:

- a) Líquido uterino (LU). El cual se obtuvo directamente del órgano de una hembra embarazada en el cuarto día.
- b) Suero de rata (SR). El cual se obtuvo a partir de sangre extraída del animal por medio de punción cardíaca (36).
- c) Medio basal de Eagle modificado y suplementado (MBS).

Este medio F10 suplementado con 20% de suero de rata y se le agregó además: Glucosa (1 g./lt.), Glutamina (0.192 g./lt.), Bicarbonato de sodio (0.35 g./lt.), Piruvato de sodio (0.028 g./lt.) y Penicilina (100 UI/lt.).

- a) medio basal de Eagle modificado sin suplemento (MB). Medio basal de Eagle como el descrito en el inciso (c) sin suplemento sérico.
- e) solución salina con base en Earle modificada (SSE). Esta solución salina es la que conforma al medio basal de Eagle y se le agregó: Glucosa (1 g./lt.), Bicarbonato de Sodio (0.35 g./lt.), Piruvato de Sodio (0.028 g./lt.) y Penicilina (100 UI/lt.).
- f) solución salina con base en Earle modificada y suplementada (SSES). Solución salina como la descrita en el inciso (e) suplementada con 20% de suero de rata.

C) Sistemas de Cultivo.

Con la finalidad de obtener una uniformidad en las observaciones del desarrollo embrionario, los embriones siem-

pre fueron colectados a las 17.00 horas del cuarto día del embarazo.

Los sistemas de cultivo empleados fueron:

- a) En microgota. Este sistema es el descrito por Brinster (4) y consiste básicamente en colocar pequeñas gotas de medio (de 0.05 a 0.10 ml.) sobre una caja de Petri de vidrio siliconizada previamente y cubiertas con aceite de parafina líquida. Este sistema fue utilizado para los medios SR y LU.

- b) Tubo Leighton. Este sistema se empleó para los medios MES, MBE, SSE y SSEs. La cantidad de medio que se utilizó en cada tubo Leighton fue de 1.5 mililitros.

El cultivo de los embriones se realizó a 37°C en una estufa de temperatura regulada.

D) Desarrollo Embrionario.

En cada tratamiento se colocaron diez embriones, repitiendo cada evento cinco veces. La observación del desarrollo embrionario se efectuó al día siguiente al que fueron cul

tivados.

Al considerar los estudios realizados anteriormente en el laboratorio, se ha visto que los embriones de rata de 8 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 es esta dio de mórula.

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

IV) RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del desarrollo de los embriones de rata en el estadio de 8 células se encuentran ilustrados en las siguientes fotografías, así como resumidos en la tabla 1, en donde se incluyen tanto los porcentajes de los embriones que progresaron como los que se contrajeron durante el cultivo.

Los medios de cultivo que no permitieron el desarrollo de los embriones de rata fueron el líquido uterino, el suero de rata y la solución salina con base en Earle sin suplemento sérico.

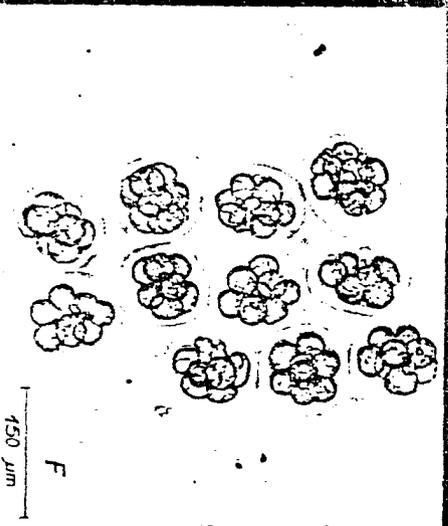
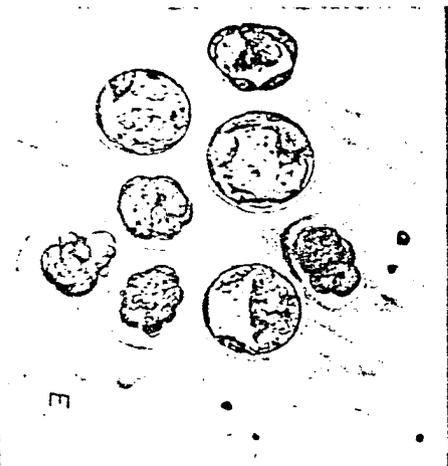
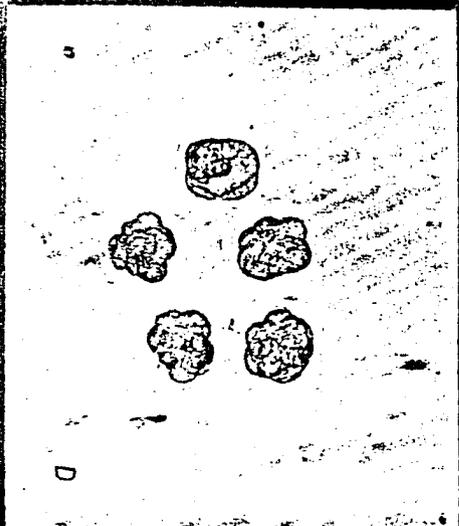
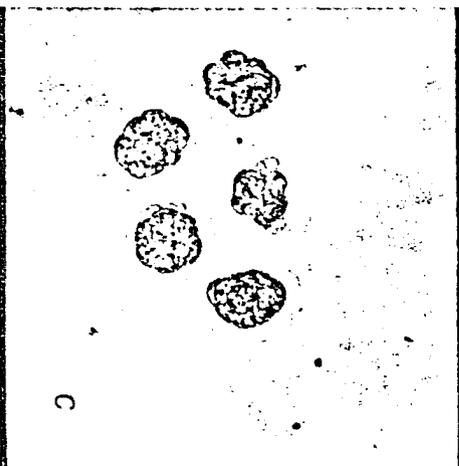
De las observaciones realizadas durante el cultivo, empleando los medios anteriores, cabe resaltar que los embriones cultivados en líquido uterino sufrieron una degeneración completa, no así los que se encontraban en SR y SSE.

Los embriones cultivados en el medio SR adquirieron una apariencia granulosa y ocasionalmente alguno llegaba a formar pequeños espacios en su interior de aspecto variable.

Tabla 1. Cultivo de embriones de rata Wistar en la etapa de 8 células bajo diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Porcentaje de blastocistos desarrollados	Observaciones
Líquido Uterino (LU)	0	Degeneración embrionaria
Suero de Rata (SR)	0	Granulación embrionaria
Medio basal de Eagle modificado (MBE)	73.7	Porcentaje más alto logrado
Medio basal de Eagle modificado y suplementado (MBES)	61.7	
Solución salina con base en Earle modificada (SSE)	0	Descompactación parcial
Solución salina con base en Earle modificada y suplementada (SSES)	64.3	

- FOTOGRAFIA: A) Embriones de rata en el estadio de 8 células.
- B) Embriones degenerados, después de haber sido cultivados en líquido uterino.
- C) Embriones de aspecto granuloso después de su cultivo en suero de rata.
- D y E) Desarrollo embrionario logrado en los medios: medio basal de Eagle modificado, medio basal de Eagle modificado y suplementado y solución salina con base en Earle modificada y suplementada.
- F) Descompactación embrionaria posterior al cultivo en la solución salina con base en Earle modificada.



los embriones cultivados en SSE adquirieron un aspecto de semidescompactación celular al principio y posteriormente la mayoría tendió hacia la degeneración.

Los embriones cultivados en MBE, MBES y SSES lograron en diferentes porcentajes (73.7%, 61.7% y 64.3% respectivamente) el desarrollo de los embriones de rata de 8 células al estado de blastocisto.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se analizarán de manera independiente.

A) Cultivo en líquido uterino.

El estado de 8 células, es la última etapa de la preimplantación embrionaria que se localiza en el oviducto (34-35) del animal, y más específicamente en su porción terminal o región uterotubárica, ya que el siguiente estadio o blastocisto se desarrolla cuando el embrión de 8 células comienza a ingresar en el lumen uterino, esto en el caso de blastocistos pequeños como el de la rata (12).

Tomando en cuenta lo anterior, se pensó durante el desarrollo del presente trabajo que el líquido uterino de una

hembra embarazada en el cuarto día poseería los elementos necesarios para el desarrollo y diferenciación de un embrión de 3 células.

Sin embargo, al observar los resultados de degeneración embrionaria obtenidos en este medio, es de suponer que las condiciones ambientales entre el líquido tubárico y el uterino son muy distintas, por lo que un embrión de 8 células al no estar en contacto con las sustancias de la región adecuada es incapaz de utilizar los elementos presentes en esta, no obstante para que esto sea posible debe el embrión encontrarse en la etapa de blastocisto temprano.

B) Cultivo en suero de rata.

Purshottam y col. (27) reportaron haber logrado un alto porcentaje de desarrollo embrionario en conejo utilizando únicamente como medio de cultivo un suero homólogo.

en los resultados obtenidos cuando se cultivó a los embriones de rata en un suero homólogo, los embriones adquirieron un aspecto granuloso y sólo ocasionalmente alguno llegó a formar un espacio pequeño en su interior y

de apariencia atípica.

Esto sugiere que el suero de rata a diferencia del de conejo (27), no posee todos los elementos apropiados que permiten el desarrollo y diferenciación de un embrión de 8 células.

C) Cultivo en solución salina con base en Earle modificada.

Este medio de cultivo a pesar de que se encuentra enriquecido con dos fuentes importantes de energía para el embrión, como lo son el piruvato de sodio y la glucosa, son estas incapaces junto con las sales del medio de permitir el desarrollo de los embriones de rata. Más aún, los embriones adquieren un aspecto de descompactación parcial después de un período de cultivo en este medio.

Estos resultados apoyan a los descritos por Willmer (36) sin embargo son diferentes a los reportados por Cholewa y Whitten (13).

D) Cultivo en solución salina con base en Earle modificada.

y suplementada.

Al tomar en cuenta las observaciones realizadas en los medios anteriores, se decidió combinar la solución salina con el suero con la finalidad de formar de esta manera un solo medio de cultivo suplementado, y así permitir que los factores de ambas soluciones que estimulan el desarrollo embrionario se mezclen y actúen de manera conjunta.

El resultado de la combinación de la solución salina con el suero, fue el desarrollo de los embriones de rata en el estadio de 8 células.

E) Cultivo en solución o medio de Eagle modificado y en uno suplementado.

Al utilizar los medios MBE y MBES para el cultivo de los embriones de rata, se observó que ambos poseían la capacidad de permitir el desarrollo de estos.

A pesar de que el medio MBE carece de los elementos séricos, logró el más alto porcentaje (73.7%) en el desarrollo de los embriones de rata, a pesar de que Konwinski y col.

(23) reportan que el suero es indispensable para la diferenciación de la masa celular interna del blastocisto. Aunado a lo anterior, este medio se encuentra enriquecido además de las fuentes de energía, piruvato y glucosa, por una gran variedad de aminoácidos y vitaminas las cuales en conjunto han permitido el desarrollo de los embriones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Brinster (7), Cholewa y Whitten (13), Gwatkin y Fairri (19) y Whittingham (35).

La diferencia en el porcentaje encontrado entre los medios MBES y MBE, 61.7% y 73.7% respectivamente, puede ser explicada por el hecho de que el suero al ser un compuesto no muy bien caracterizado (1) puede contener de igual manera elementos que permitan el desarrollo de los embriones así como otros que limiten tal proceso, de esta manera, el medio MBE al no poseer ningún factor sérico no cuenta con elementos que puedan modificar ni positiva o negativamente la acción de sus propios componentes.

V) CONCLUSIONES

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

- 1) Que solamente una solución salina fisiológica puede ser utilizada como medio de cultivo para embriones de rata, siempre y cuando se encuentre convenientemente suplementada con los nutrientes apropiados.
- 2) Que tanto el líquido uterino como el suero de rata al ser utilizados como medios de cultivo, impiden el desarrollo in vitro de los embriones de rata.
- 3) Que la incorporación de aminoácidos o suero a una solución salina fisiológica permite el desarrollo en el laboratorio de los embriones de rata.

Los conocimientos que se adquirieran con los métodos de cultivo de embriones en el laboratorio, así como con los ya existentes en las técnicas de micromanipulación, será posible controlar y dirigir los procesos del desarrollo embrionario.

VJ) REFERENCIAS

- 1) Barnes, D. Y Sato, G., 1980. Methods for growth of cultured cells in serum - free medium. Anal. Biochem., 102: 255-270.
- 2) Biggers, J.D., Gwatkin, R.B.L. y Brinster, R.L., 1962. Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. Nature., 194: 747.
- 3) Borland, R., Biggers, J.D. y Lechene, C.P., 1977. Studies on the composition and formation of mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis. Devel. Biol. 55: 1-8.
- 4) Brinster, R.L., 1963. A method for in vitro cultivation of mouse ova from two - cell to blastocyst. Expl Cell Res., 32: 205-208.
- 5) Brinster, R.L., 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. J. Exp. Zool., 158: 49-58.
- 6) 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.

- 7) Brinster, R.L., 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. III. The effect of fixed - nitrogen source. J. Exp. Zool., 158: 69-78.
- 8) Brinster, R.L., 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy source. J. Reprod. Fert. . 10: 227-240.
- 9) Brinster, R.L., 1967. Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. J. Reprod. Fert., 13: 413.
- 10) Brinster, R.L., 1968. Effect of glutathione on the development of two - cell mouse embryos in vitro. J. Reprod. Fert., 17: 521.
- 11) Brinster, R.L., 1969. The incorporation of carbon from glucose and pyruvate into the preimplantation mouse embryo. Expl. Cell Res., 58: 153.

- 12) Brinster, R.L., 1974. Embryo development.
J. Anim. Sci., 38: 1003-1012.
- 13) Cholewa, J.A. y Whitten, W.K., 1970. Development of two - cell mouse embryos in the absence of a fixed - nitrogen source. J. Reprod. Fert., 22: 553-555.
- 14) Copp, J., 1978. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. I. A study of cellular proliferation. J. Embryol. Exp. Morph., 48: 109-125.
- 15) Ducibella, Th. y Anderson, E., 1975. Cell shape and membrane changes in the eight - cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. Devl. Biol., 47: 45-58.
- 16) Fishel, S.B. y Surani, M.A.H., 1978. Changes in responsiveness of preimplantation mouse embryos to serum. J. Embryol. Exp. Morph., 45: 295-301.
- 17) Granholm, N.H. y Brenner, G.M., 1976. Effects

of cytochalasin B (CB) on the morula to blastocyst transformation and trophoblast outgrowth in the early mouse embryo.

Expl. Cell Res., 101: 143-153.

18) Graves, C.N. y Biggers, J.D., 1970. Carbon dioxide fixation by mouse embryos prior to implantation. Science, N.Y., 167: 1506.

19) Gwatkin, R.B.L. y Haidri, A.A., 1973. Requirements for the implantation of hamster oocytes in vitro. Expl. Cell Res., 76: 1-7.

20) Hafez, E.S.E., 1974. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea & Febiges, Philadelphia.

21) Hammond, J. Jr, 1949. Recovery and culture of tubal ova. Nature, Lond., 163: 28.

22) Hsu, Y.Ch., Baskar, J., Stevens, L.C. y Rash, J. E., 1974. Development in vitro of mouse embryos from the two - cell egg stage to the early somite stage. J. Embryol.

Exp. Morph., 31: 235-245.

- 23) Konwinski, M., Solter, D. y Koprowski, H., 1978.
Effect of removal of the zona pellucida on
subsequent development of mouse blastocysts
in vitro. J. Reprod. Fert., 54: 137-143.
- 24) McLaren, A. y Biggers, J.D., 1958. Successful de-
velopment and birth of mice cultivated in
vitro as early embryos. Nature., 182: 877.
- 25) McMahon, D., 1974. Chemical messengers in develop-
ment: A hypothesis. Science., 185: 1012.
- 26) Mintz, B., 1967. Methods in developmental biology.
F.H. Wilt y N.K. Wessels. Thomas Y. Crowell,
New York.
- 27) Purshottam, N. y Pincus, G., 1961. In vitro cultiva-
tion of mammalian eggs. Anac. Rec., 140: 51.
- 28) Rugh, R., 1964. Vertebrate embryology. The dynamics
of development. Harcourt, Brace & World, Inc.
New York.

- 29) Smith, R. y McLaren A., 1977. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. J. Embryol. Exp. Morph., 41: 79-92.
- 30) Tarkowski, A.K. y Wroblewska, J., 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. J. Embryol. Exp. Morph., 18: 155-180.
- 31) Wales, R.G., Quinn, P. y Murdock, R.N., 1969. The fixation of carbon dioxide by the eight - cell mouse embryo. J. Reprod. Fert. 20: 541.
- 32) Whitten, W.K., 1956. Culture of tubal mouse ova. Nature, Lond., 177: 96.
- 33) Whitten, W.K., 1957. Culture of tubal ova. Nature, Lond., 179: 1081.
- 34) Whitten, W.K. y Dagg, C.P., 1961. Influence of spermatozoa on the cleavage rate of mouse eggs. J. Exp. Zool., 148: 173-183.
- 35) Whittingham, D.G., 1973. Culture of mouse ova.

J. Reprod. Fert., 17: 7-21.

- 36) Willmer, E.N., 1965. Cell and tissues in culture methods, biology and physiology. Acad. Press. New York.