



Universidad Nacional Autónoma de México

EVALUACION DE DIFERENTES METODOS PARA LA COLECCION DE EMBRIONES DE RATA DE LABORATORIO

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por
LAURA KIESWETTER RUBIO



Asesores. Biol. Raúl Astiazarán Ybarra
y el M.V.Z. Jorge Avila García

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Con todo cariño a mis padres Emilio y Margarita por su ejemplo y gran sacrificio para que yo llegara a mi meta y por la confianza que me tuvieron.

A mis hermanas Thania, Maggy, Esther, Sandra, Diana y Elsie por su apoyo en todo momento a pesar de la distancia.

A mi hermano Emilio José por su ejemplo y consejos que siempre me alentaron para seguir adelante.

A mi cuñado Alberto por el apoyo que siempre me ha dado.

A mi novio Alex por los consejos y apoyo que me ha brindado.

A la familia García Rendón y López por estar conmigo cuando más los necesité y la amistad que me ofrecieron.

A la familia Navarrete Silva por hacerme sentir como en mi casa.

A mis amigos por compartir conmigo los momentos difíciles y los de alegría.

A mi facultad por haberme ofrecido lo que toda mi vida soñé.

Al Dr. Arturo Enríquez, Marta, Telmo y Polo por hacer más agradable los momentos de trabajo y compartir las experiencias.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Raúl Astiazarán Y. por sus conocimientos y la realización de este trabajo.

A mi asesor Jorge Avila García como un gran maestro y por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y a su familia gracias por la confianza que me dieron.

A Luis Lecuona por la ayuda estadística que me ofreció sin interés alguno.

Al Honorable miembro del jurado por las modificaciones y los consejos que me dieron para la conclusión de la tesis.

A todos mis profesores por los conocimientos que me impartieron a lo largo de la carrera.

A todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	3
II. 1. Antecedentes e Importancia de la Transferencia de Embriones	3
II. 2. Transporte Embrionario	4
II. 3. Obtención de Embriones	5
II. 4. Importancia de los Animales de Laboratorio	8
III.- MATERIAL Y METODOS	10
III. 1. Obtención de Embriones	10
III. 2. Material de Laboratorio	11
III. 3. Métodos de Colecta	11
III. 4. Análisis Estadístico	13
III. 5. Registro Fotográfico	13
IV.- RESULTADOS	14
V.- DISCUSION	15
VI.- LITERATURA CITADA	19
VII.- CUADROS	22
VIII.- FIGURAS	28

RESUMEN

KIESWETTER RUBIO LAURA. Evaluación de diferentes métodos para la colección de embriones de rata de laboratorio, (bajo la dirección del Biol. Raúl Astiazarán Ybarra y el M.V.Z. Jorge Avila García).

Se evaluaron diez métodos utilizados para la obtención de embriones de rata, con el objeto de determinar cual de ellos es el más eficiente tomando como parámetros el porcentaje de recuperación, tiempo de localización y la morfología embrionaria.

Los métodos de colecta para embriones evaluados fueron los siguientes: tubo de centrifuga, tubo de ensaye de 120 ml, tubo de ensaye de 35 ml, pipeta volumétrica modificada, embudo de separación, jeringa, probeta cilíndrica, filtro, probeta cónica y caja de Petri. Para cada uno de estos métodos se dispuso de 90 embriones de rata en total, ya que los eventos se repitieron 5 veces.

La información obtenida se analizó mediante el Análisis de Varianza y la prueba de Tukey, encontrándose diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de recuperación ($P < 0.01$). Al emplear el filtro y la caja de Petri, se recuperaron el 97 y 98% de embriones respectivamente, siendo estos valores estadísticamente similares; al utilizar los métodos de tubo de centrifuga y jeringa, se recuperó el 71 y el 70% de embriones respectivamente. Estos cuatro métodos resultaron estadísticamente superiores a los demás en cuanto a porcentaje de recuperación.

Al emplear la caja de Petri y el filtro se registraron los tiempos más cortos para la localización de los embriones invirtiéndose 14 y 15 minutos --

- 2 -

respectivamente.

No se observaron cambios en la morfología embrionaria con ninguno de los -
diez métodos de colecta evaluados.

II. INTRODUCCION

Aunque los ovarios de los mamíferos contienen cientos de miles de óvulos, el número de prole que una hembra produce es pequeño con relación a dicho número. En los animales domésticos, el número de veces que una hembra puede quedar gestante se ve limitado por el periodo que dura la gestación. Más aún, sólo uno o dos óvulos se liberan en cada ciclo estral en las especies que no producen camadas. El número de crías que una hembra puede producir durante su vida, se incrementa en gran medida por medio de la técnica de transferencia de embriones (16).

II. 1. Antecedentes e Importancia de la Transferencia de Embriones.

En términos generales la transferencia de embriones consiste en la extracción de un embrión en las primeras fases de su desarrollo del aparato reproductor de una hembra y su posterior implantación en el de otra hembra, donde el embrión completará su desarrollo hasta el nacimiento (12).

↳ Betteridge menciona que la transferencia de embriones se remonta al año 1890, cuando Heape logró transferir un embrión del tracto reproductor de una coneja al de otra, obteniendo resultados satisfactorios (3). Cin-cuenta años más tarde, otros investigadores como Warwick y col., experimen-taron con embriones de oveja, pero no como una investigación de laborato--rio simplemente, sino dándole un enfoque más práctico a su trabajo (24). ↵

Desde finales de la década de los cuarentas hasta la fecha, esta técnica ha despertado gran interés dentro de las personas dedicadas a la cién

cia animal, como un instrumento de reproducción y utilizándola a nivel comercial.

Actualmente, más del 90% de la actividad comercial de la transferencia de embriones, ha sido enfocada hacia el ganado bovino. Sin embargo esta técnica puede ser aplicada a otras especies y muy adecuadamente a aquellas que están en peligro de extinción (18).

Las ventajas que la transferencia de embriones ofrece a los ganaderos son muchas y entre ellas tenemos (13, 24):

- a.- Aumenta la capacidad reproductiva de una hembra.
- b.- Permite aprovechar el potencial genético de hembras que sufren lesiones o que por cualquier razón no pueden gestar o parir, pero que son fértiles.
- c.- Se acorta el intervalo entre generaciones, mediante la superovulación de hembras adultas.
- d.- El trasplante de embriones de razas finas a receptoras nativas de baja productividad, permite utilizar el potencial genético de aquellas en un ambiente completamente diferente.
- e.- Permite la incorporación de nuevas razas y líneas de éstas a regiones donde las leyes prohíben la importación de animales.

II. 2. Transporte Embrionario.

Una vez realizada la fertilización en el oviducto se inicia el transporte del embrión a través de éste, siendo característica de cada especie la duración que se requiere para que alcancen el útero (Cuadro No. 1), (6, 15), durante el descenso de los embriones se llevan a cabo las primeras e-

tapas de la diferenciación embrionaria (16).

La velocidad de progresión del embrión en el oviducto presenta modificaciones importantes, las cuales van a depender de la zona en que se encuentren, ya que se ha demostrado en el conejo que en ciertas porciones de la trompa de Falopio hay retención del embrión, mientras que en otras, la velocidad de traslado se ve incrementada considerablemente (8,14).

Entre los factores que se han considerado que intervienen en la regulación del transporte de los embriones, destacan las contracciones musculares y el movimiento ciliar, mismos que son influidos por estrógenos y progesterógenos (21), así como también los fluidos tubáricos e uterinos.

II. 3. Obtención de Embriones.

Huntér menciona que el mejor momento para extraer los embriones del animal donante, es cuando ya han penetrado en el útero, es decir al menos 3 días después de la ovulación, sólo entonces se pueden emplear métodos no quirúrgicos. Sin embargo, en muchos laboratorios se están desarrollando o aplicando métodos no quirúrgicos para extraer los embriones del lumen uterino (Rowson y Dowling, 1949), muchos equipos prefieren utilizar un método quirúrgico- laparotomía lateral o ventral-, que ofrece más garantías en términos de la proporción de embriones recogidos. Los sistemas quirúrgicos tienen la desventaja de que se puede utilizar muy pocas veces al donante, debido al problema de adherencias en el conducto genital, al debilitamiento de la pared del cuerpo y al crecimiento de tejido en las cicatrices. La laparotomía se realiza bajo anestesia general; se expone el aparato reproductor y se recogen los embriones en una placa de vidrio, después de perfundir el útero con una solución salina suplementada con suero. Este medio se

introduce en el lumen con una jeringa y una aguja, extendiéndolo a lo largo de la trompa uterina, con presión digital, y recogiénolo con una cánula de goma o de vidrio convenientemente colocada. Generalmente, los animales donantes no se usan más de tres veces, después de lo cual se les devuelve a su rebaño para que se reproduzcan naturalmente (18).

Los métodos no quirúrgicos descritos en 1977 por Brand y Drost (4), - como por ejemplo en la vaca, pretenden recoger embriones de la porción superior de las trompas uterinas, generalmente de 6 a 8 días después de la ovulación. En la mayoría de estas técnicas se utiliza un método sencillo para introducir y recuperar el medio a través del cervix, con la vaca totalmente consciente y en posición erguida, aunque preferiblemente con las patas delanteras algo más altas que las traseras. Se acostumbra administrar un anestésico epidural para impedir la defecación y las contracciones rectales. El aparato de perfusión suele ser un catéter de Foley modificado de tres ramas, usándose un balón inflable para cerrar la extremidad caudal de la trompa uterina antes del lavado (Ver, Figura No. 8). En el momento de insertar el catéter, se le acopla un estilete que lo pone rígido, para poder pasar por el canal cervical y penetrar en la trompa uterina. La obtención de embriones aumenta cuando se emplean grandes cantidades de medio para lavar el contenido del útero (aproximadamente 500 ml), y también masajando per rectum el útero dilatado por el líquido. En lo que respecta a los embriones, el procedimiento de buscarlos entre los residuos endométricos acumulados en el fondo del recipiente, puede ser largo y difícil y hay que tomar precauciones para reducir el peligro de contaminación bacteriana durante este proceso (18).

Los embriones (o los óvulos degenerados) se identifican en un recipiente de vidrio con un microscopio de disección. Durante todas las manipulacio

nes hay que mantener estrictas condiciones de asepsia. Los embriones seleccionados para el trasplante, en virtud de su morfología, se pueden mantener en una incubadora a 35°-37°C, o a la temperatura ambiente (18°-20°C) durante varias horas en un medio de cultivo adecuado, pero hay que tener cuidado para impedir un "shock" de temperatura, un cambio de pH, o la evaporación (18).

Existe una gran variedad de recipientes para la colección de embriones, sin embargo, hay poca información en la literatura con respecto a la eficiencia de éstos. Dentro de lo más recientemente ideado, se encuentra el sistema de filtración con el cual se ahorra mucho tiempo en la búsqueda de los embriones, no obstante, tiene el inconveniente de no encontrarse con facilidad y de ser desechable.

Pugh y col. (1980), mencionan en su trabajo que con el filtro que ellos diseñaron con red de plancton, se localizaron los embriones en tan sólo 10 minutos de iniciada su búsqueda. Sin embargo, existe el inconveniente de que si hay moco uterino y residuos celulares en el lavado, éstos pueden bloquear la red, por lo que la velocidad de filtración se vé disminuída (20).

Otros investigadores como Baker y Jillella (1), Brand y Drost (4), Newcomb y col. (19), Seidel (23) y Sreenám y Diskin (25), han utilizado diversos métodos de colección de embriones, como por ejemplo, el tubo de ensaye y la probeta graduada. En estos métodos, se deja sedimentar el lavado por un lapso de 30 a 45 minutos antes de extraer del fondo un volumen de 30 ml de medio con la finalidad de depositarlos en una caja de Petri para su posterior observación.

Betteridge y col. (2) y Newcomb y col. (19), han empleado como reci---

piente para coleccionar el lavado uterino un matraz de bola al cual lo cortaron por la mitad y utilizaron su parte inferior. Sin embargo, Newcomb y col. comentan que los tubos de ensayo empleados para tal fin son mucho más satisfactorios ya que éstos últimos son más económicos y pueden esterilizarse y limpiarse más fácilmente.

Otros métodos o instrumentos de colecta son el matraz de Erlenmeyer y el embudo de separación, y al emplear los mismos se debe dejar reposar el lavado uterino que contengan, para que los embriones y detritos celulares sedimenten (5,10,11,22).

Una vez que se han identificado los embriones, éstos pueden ser colocados ya sea en cajas de Petri o en vidrios de reloj para su evaluación morfológica (5,10,11).

II. 4. Importancia de los Animales de Laboratorio.

Siendo que el transplante de embriones en ganado bovino en el país es una técnica que cada día cobra mayor difusión, y dada su innegable utilidad para la obtención de animales de alto valor genético y productivo, es preponderante ahondar en la investigación en este campo con la finalidad de mejorar los resultados de esta técnica.

La obtención de embriones es un punto en el proceso de transplante que merece especial atención, pues depende mucho de ella el éxito o el fracaso de la misma. Por consiguiente, al existir varios recipientes para su obtención es importante analizar cual de ellos es el más eficiente y práctico, para que garantice los mejores resultados.

En el presente trabajo se utilizaron embriones de rata (Rattus norve-

gicus) variedad Wistar, en la etapa de blastocisto por las siguientes razones:

- a.- Por lo económico que resultan estos animales.
- b.- Por la cantidad de embriones que producen sin la necesidad de utilizar hormonas de superovulación.
- c.- Debido a que la morfología de los embriones de rata en la etapa de --- blastocistos al ser semejante al de otras especies de mamíferos (bovinos, ovinos, etc.), puede ser considerado como un modelo ideal de estudio.

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se planteó el objetivo de evaluar cual de los distintos métodos de colecta de embriones es el más eficiente, con base en el porcentaje de recuperación, tiempo de localización y morfología embrionaria; se esperaba encontrar diferencias en el tiempo y porcentaje de recuperación embrionaria con los diferentes métodos de colecta de embriones de rata.

III. MATERIAL Y METODOS

III. 1. Obtención de Embriones.

Los embriones utilizados en el presente trabajo se obtuvieron de ratas Wistar de 3 a 4 meses de edad, a las cuales, después de detectarlas en estro mediante citología exfoliativa a partir de un frotis vaginal, se colocaron en jaulas con machos fértiles en una relación de 1:1, confirmándose la cópula, un día después por medio de la presencia del tapón vaginal o de espermatozoides.

El estadio embrionario utilizado fue el de blastocisto, el cual se colectó en el quinto día de gestación. El sacrificio de las donadoras se llevó a cabo por dislocación cervical, para posteriormente incidir en forma de "V" en la región lateral, previa desinfección con una solución diluída (1:100) de cloruro de benzalconio, y exponer el aparato reproductor (Ver, Figuras 1.A y 1.B).

Se perfundió el órgano a través de la región útero-tubárica utilizando una aguja del No. 27. Para lograr perfundir completamente el órgano se requirieron 2 ml de medio. El líquido de perfusión se colectó en cajas de Petri para su posterior observación al microscopio (Ver, Figuras 1.C y 2.A).

Todos los embriones colectados se lavaron dos veces en medio fresco, con el objeto de eliminar los restos celulares que los acompañan. Las operaciones de colecta y traslado de embriones se realizaron utilizando una pipeta Pasteur cuya punta poseía un diámetro aproximado de 150 μ m, con la finalidad de colectar el mínimo medio posible junto con los embriones considerados morfológicamente normales fueron sometidos a los tratamientos experimentales (Ver, Figura 2.B).

III. 2. Material de Laboratorio.

Las características del material que se utilizó se encuentran anotadas en el inciso "III. 3. Métodos de Colecta".

Todo el equipo se esterilizó previamente a su uso en el autoclave --- (1.5 Kg/cm² durante 30 minutos), a excepción del filtro que se esterilizó con gas (óxido de etileno). Los instrumentos que estuvieron en contacto directo con los embriones se siliconizaron empleando una solución acuosa de silicón al 1% con la finalidad de evitar que éstos se adherieran a sus superficies.

El medio que se empleó tanto para coleccionar los embriones como a lo -- largo del presente trabajo fue la solución salina fosofatada de Dulbecco - (PBS), la cual se suplementó con: 1 g/lit de glucosa; 0.028 g/lit de piruva to de sodio; 100 UI/ml de penicilina G sódica y 1% de suero de ternera --- (Ver, Figuras 3.A y 3.B).

III. 3. Métodos de Colecta.

Los diferentes métodos que se evaluaron se clasificaron de la siguien te manera:

A.- Métodos Directos.- Son aquellos recipientes que pueden ser colo cados directamente al microscopio para la localización de los embriones, o aquellos que requieren de una previa filtración del líquido de perfusión. Dentro de este inciso se estudiaron:

- 1.- Cajas de Petri grandes (30 ml) (8.5 X 1.3 cm) (Ver, Figura 5.A).
- 1.- Filtro Comercial (Marca Em Con) (60 ml) (Ver, Figura 5.B).

B.- Métodos de Precipitación.- Son aquellos en donde la solución salina que contiene los embriones debe dejarse "reposar" con la finalidad de que los embriones se sedimenten en el fondo (Ver, Figura 7.D). Posteriormente se toman de 5 a 8 ml del fondo de estos recipientes y se depositan en cajas de Petri chicas (3.3 X 1.0 cm), para la búsqueda de los embriones (Ver, Figura 5.C).

Los instrumentos que se utilizaron para obtener las alícuotas fueron pipetas graduadas de 1 y 10 mililitros controladas por una propipeta, la cual es un bulbo de hule que se adapta a las pipetas con la finalidad de controlar de manera estéril la succión y expulsión de los líquidos (Ver, Figura 5.C).

Para obtener el tiempo en que un embrión de rata tarda en sedimentar en una solución PBS suplementada con 1% de suero de ternera, se emplearon tubos de ensaye de 5 ml y un microscopio invertido* (Ver, Figuras 6.B y 3.D). Con estos resultados (tiempo de sedimentación por distancia recorrida) se calcularon los tiempos que debían permanecer en reposo los distintos recipientes, antes de proceder a coleccionar las alícuotas que contenían los embriones de su fondo.

Los métodos de precipitación estudiados fueron:

- a.- Tubo de centrifuga de 50 ml Ver, Figura 3.C).
- b.- Tubo de ensaye de 35 ml (Ver, Figura 3.D).
- c.- Tubo de ensaye de 120 ml (Ver, Figura 3.D).
- d.- Pipeta volumétrica modificada de 45 ml (Ver, Figura 6.D).

* Olympus, Tokyo.

- e.- Probeta cilíndrica de 100 ml (Ver, Figura 6.C).
- f.- Probeta cónica de 125 ml (Ver, Figura 7.A).
- g.- Embudo de separación de 500 ml (Ver, Figura 7.B).
- h.- Jeringa de vidrio de 50 ml (Ver, Figura 7.C).

Una vez que se obtuvieron los embriones recuperados de cada recipiente se procedió a examinar la morfología embrionaria de éstos.

III. 4. Análisis Estadístico.

Para la evaluación de los diversos métodos de colecta se emplearon - 90 embriones para cada uno. Los resultados obtenidos se analizaron por medio de las pruebas estadísticas de Análisis de Varianza (9) y de Tukey (7), tomando en consideración como parámetro el porcentaje de recuperación embrionaria.

III. 5. Registro Fotográfico.

El registro fotográfico de los embriones se llevó a cabo empleando - un microscopio de contraste de fases con cámara integrada* y película para impresiones en blanco y negro** (Ver, Figura 6.A).

Las fotografías de los diferentes métodos de colecta así como de las operaciones, se llevaron a cabo utilizando una cámara tipo Reflex*** con película para impresiones en color****.

* Olympus, Tokyo.

** Kodak Panatomic X, FX-135-36/asa 32

*** Minolta, XG-A.

**** Kodak, 135-36/asa 100.

IV. RESULTADOS

En el estudio sobre sedimentación de blastocistos de rata, se encontró que éstos lo hacían a una velocidad de 1 cm/min cuando se encontraban en una solución PBS suplementada con 1% de suero de ternera.

Los porcentajes de recuperación embrionaria en los diferentes métodos empleados se encuentran descritos en el Cuadro No. 2. De los métodos anteriores cabe señalar que la caja de Petri y el filtro fueron los que obtuvieron el valor más alto de recuperación (97.8 y 97.0% respectivamente), en contraste con el tubo de ensaye de 35 ml y la pipeta volumétrica modificada, los cuales obtuvieron los porcentajes menores (20.8 y 15.2% respectivamente).

En el Cuadro No. 3 se observan los tiempos que se invirtieron en la localización de los embriones en cada uno de los métodos. El promedio de tiempo general fue de 23.6 minutos; correspondiendo al empleo de la caja de Petri y del filtro, los tiempos más breves (14 y 15 minutos respectivamente) y al de las probetas cilíndrica (30 min) y cónica (30 min), así como al tubo de ensaye de 120 ml (35 min) los tiempos más largos.

A lo largo del presente trabajo, no se observaron cambios morfológicos en los embriones que se emplearon para la evaluación de los diferentes métodos de colecta.

Al analizar los resultados de recuperación embrionaria, empleando las pruebas estadísticas (Cuadro No. 4 y 5), se encontró una diferencia altamente significativa estadísticamente ($P = 0.01$) entre los 10 métodos evaluados.

V. DISCUSION

Existe diferencia en la forma de recuperación de los embriones dependiendo de si el método de colecta es directo o de precipitación.

Cuando se emplean cualquiera de los recipientes que requieren de la sedimentación de los embriones, es de suma importancia conocer la velocidad de sedimentación de éstos, la cual va a depender de la masa/volumen -- del estadio y especie de embrión de que se trata, así como de la densidad o viscosidad del medio de colecta.

De esta manera, un embrión de rata en el estadio de mórula o blastocisto se va a sedimentar más lentamente que uno de bovino en los mismos estadios, ya que los primeros son aproximadamente un tercio más chicos que los segundos.

Asímismo, la velocidad de sedimentación de los embriones se va a ver influida si el medio en que se encuentran es más denso, ya sea porque contiene una mayor concentración de suero, (por ejemplo 15% ó 20%), o porque posee moco y/o flúidos uterinos del animal, los cuales al incrementar la viscosidad de éste van a retardar la caída de los embriones.

Como ya se mencionó anteriormente, no se observaron alteraciones morfológicas de los embriones a lo largo del presente estudio. Sin embargo, es importante señalar que si bien los embriones de mamíferos en los estadios de preimplantación poseen gran resistencia durante su estancia fuera del ambiente materno, pueden sufrir cambios en su viabilidad desde el punto de vista fisiológico (los cuales no se pueden detectar bajo el microscopio), si son expuestos a cambios de temperatura, osmolaridad y pH, princi-

palmente antes de ser transferidos a la hembra receptora.

Rowe y col. (22) mencionan que Dracy y Peterson en 1950 encontraron únicamente dos embriones degenerados en los primeros 35 ml, cuando emplearon el embudo de separación, lo cual pudo ser debido, como explican los autores, a la llave de paso que posee dicho recipiente en su parte inferior. En el presente trabajo al utilizar el sistema anterior no se observaron alteraciones en los embriones.

Tomando en consideración el porcentaje y el tiempo de recuperación de los embriones, los métodos de colecta pueden ser analizados de la siguiente manera:

A.- Filtro.

El filtro fue el sistema que se encontró más adecuado para la colecta de embriones, ya que además de poseer un alto porcentaje de recuperación en tan sólo 15 minutos se puede filtrar y revisar un volumen de 500 a 750 mililitros de medio.

Diversos autores como Pugh y col. (20) y Huels y Grave (17), han utilizado igualmente el filtro como método de colecta y consideran este sistema como muy adecuado. Sin embargo, señalan que si bien el filtro permite eliminar la sangre que muchas veces acompañan al lavado, puede verse bloqueado por una excesiva cantidad de moco y detritos celulares uterinos.

El filtro comercial Em Con estudiado en el presente trabajo, posee el inconveniente de ser desechable y de difícil adquisición (Ver, Figura 4.B). Sin embargo, es posible substituirlo por mallas de plancton de 60 μ m aproximadamente, las cuales son susceptibles de ser esterilizadas ya sea por presión o por gas (Ver, Figura 4.A).

B.- Caja de Petri.

La colecta y localización de los embriones directamente en cajas de Petri da porcentajes altos (97.8%) de recuperación. Sin embargo, a pesar de que el tiempo de búsqueda promedio es de sólo 14 minutos por caja, éste se ve sumamente incrementado al tener que revisar gran cantidad de --- ellas, como consecuencia de un programa de transferencia en donde existen más de dos donadoras. Huels y Grave (17) han empleado a la caja de Petri de manera muy satisfactoria para la colecta de embriones bovinos. La ventaja principal de este métodos de colecta, es que se puede combinar -- con cualquier sistema, lo cual hace que se vuelva más versátil y eficiente.

C.- Tubo de Centrifuga; Jeringa; Probeta Cilíndrica y Embudo de Separación.

Estos cuatro métodos de colecta, requirieron en términos generales - el mismo tiempo para la localización de los embriones, observándose que - los dos primeros mostraron un porcentaje mayor en la recuperación (Cua--- dros No. 2 y 3).

Elsden y col. (11), obtuvieron el 70% de recuperación de embriones - de bovinos, cuando dejaron reposar por 30 minutos una probeta de un litro, a comparación del 57.6% encontrado en el presente trabajo utilizando em-- briones de rata y una probeta de 100 ml.

Rowe y col. (22), reportan haber utilizado el embudo de separación, -- in embargo, no mencionan su eficiencia.

Las principales desventajas de estos métodos de colecta son su costo y su utilización práctica en el campo, ya que se encuentran hechos principalmente de vidrio.

D.- Probeta Cónica; Tubo de Ensaye de 120 ml; Tubo de Ensaye de 35 ml y Pipeta Volumétrica modificada.

El porcentaje de recuperación de embriones en los métodos anteriores fue de menos del 38%, por lo cual, no es recomendable utilizarlos para dicha finalidad. Asimismo, poseen las desventajas mencionadas para los sistemas descritos en el inciso anterior.

Al revisar en la literatura sobre métodos o sistemas de colecta, no se encontró mucha información al respecto, a pesar de la importancia que poseen como ya se mencionó en la introducción.

Al considerar los resultados obtenidos en el presente trabajo, se -- puede observar que la utilización de embriones de animales de laboratorio puede permitir el desarrollo de investigaciones no costosas que tiendan a incrementar la eficiencia de los métodos actuales de transferencia de embriones.

VI. LITERATURA CITADA

- 1.- Baker, A.A. and Jillella, D.: Techniques of surgical and nonsurgical ova collection of superovulated cows. Vet. Rec., 103: 558-562 (1978).
- 2.- Betteridge, K.J., Eaglesome, M.D., Randall, G.C.P. and Mitchell, D.: Collection, description and transfer of embryo from cattle 10-16 days after oestrus. J. Reprod. Fertil., 59: 205-216 (1980).
- 3.- Betteridge, K.J.: An historical look at embryo transfer. J. Reprod.- Fertil., 62: 1-13 (1981).
- 4.- Brand, A. and Drost, M.: Embryo collection by nonsurgical methods. Embryo transfer in farm animals. A review of techniques and applica--- tions. By: Betteridge, K.J., 16-19, Monograph No. 16, Department of - Agriculture, Canada (1977).
- 5.- Brand, A., Trounson, A., Aarts, M.H., Drost, M. and Zaayer, D.: Superovulation and nonsurgical embryo recovery in the lactating dairy cow. Anim. Prod., 26: 55-60 (1978).
- 6.- Brinster, R.L.: Embryo development. J. Anim. Sci., 38: 1003-1012 --- (1974).
- 7.- Cox, D.R.: Planning of Experiments. Wiley, New York, U,S,A, 1958.
- 8.- Croxatto, H.B. and Ortiz, M.E.S.: Egg transport in the fallopian tube. Gynecol. Invest., 6: 215 (1975).
- 9.- Daniel, W.: Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. LIMUSA, México D.F. 1979.

- 10.- Drost, M., Brand, A. and Aarts, M.H.: A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. Theriogenology, 6: 503-507 (1976).
- 11.- Elsdon, R.P., Hasler, J.F. and Seidel, G.E.Jr.: Nonsurgical recovery of bovine embryos. Theriogenology, 6: 523-532 (1976).
- 12.- Farris, J.E. and Griffith, J.Q.: The Rat in Laboratory Investigation. 2a. ed. Hatner Publishing Company, U.S.A. (1971).
- 13.- Foote, R.M. and Onuma, H.: Superovulation, ovum collection, culture and transfer. A review. J. Dairy Sci., 53: 1681-1692 (1970).
- 14.- Gómez, C.V. and Croxatto, H.B.: A study of the time course of egg retention activity in the rabbit oviduct. J. Reprod. Fertil., 50: 69 (1977).
- 15.- Hafez, E.S.E.: In vitro and in vivo survival of morphologically atypical embryos in rabbits. Nature, 196: 1226-1227 (1962).
- 16.- Hicks, J.J.G. y Recans, M.E.: Características funcionales del cigoto de mamíferos durante la preimplantación. Ginecol. Obst. Mex., 47: 275-291 (1980).
- 17.- Huels, S.P. and Graves, C.N.: Techniques for isolating bovine embryos from flushings following nonsurgical embryo recovery. Proceedings of the 10 th international congress on animal reproduction and artificial insemination, 230-232. University of Illinois, Urbana, - Illinois, U.S.A. (1980).
- 18.- Hunter, R.H.F.: Fisiología y Tecnología de la Reproducción de la Hembra de los Animales Domésticos. ACRIBIA, España (1982).

- 19.- Newcomb, R., Christie, E.E. and Rowson, L.E.A.: Nonsurgical recovery of bovine embryos. Vet. Rec., 102: 414-417 (1978).
- 20.- Pugh, A., Trounson, A., Aarts, M.H. and Mcphee, S.: Bovine embryo recovery by filtration of nonsurgical flushings. Theriogenology, 13: - 281-285 (1980).
- 21.- Robler, L.S. and Carabagnon, A.C.: Effect of oestradiol 17-B and progesterone on oviductal transport and early development of mouse ova. J. Reprod. Fertil., 57: 91 (1977).
- 22.- Rowe, R.F., Del Campo, M.R., Eilts, C.L., French, L.R., Winch, R.P. and Ginther, O.J.: A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. Theriogenology, 6: 471-483 (1976).
- 23.- Seidel, G.: Superovulation and embryo transfer in cattle. Science, 211: 351-358 (1981).
- 24.- Sorensen, A.M.Jr.: Reproducción Animal, Principios y Prácticas. 2a. ed. McGraw Hill, México D.F. (1982).
- 25.- Sreenam, J.M. and Diskin, M.G.: Current efficiency of embryo transfer technology and its role in cattle breeding. Irish Vet. J., 36: - 138-144 (1982).

CUADRO No. 1

CRONOLOGIA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE DIFERENTES
ESPECIES (Adaptado de: Brinster, 1974 y Hafez, 1962).

ESPECIE	ESTADIO EMBRIONARIO (Días)					
	2 cél.	4 cél.	16 cél. (mórula)	Entrada al útero	Blasto- cisto	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	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.

CUADRO No. 2

PORCENTAJES DE RECUPERACION DE EMBRIONES EN LOS
DISTINTOS METODOS ESTUDIADOS

METODOS	PORCENTAJES (%)
a.- Caja de Petri	97.8
b.- Filtro Em Con	97.0
c.- Tubo de Centrifuga	71.2
d.- Jeringa de Vidrio	70.4
e.- Probeta Cilíndrica	57.6
f.- Embudo de Separación	50.0
g.- Probeta Cónica	37.6
h.- Tubo de Ensaye de 120 ml	26.0
i.- Tubo de Ensaye de 35 ml	20.8
j.- Pipeta Volumétrica Modificada	15.2

CUADRO No. 3

TIEMPO INVERTIDO EN LA LOCALIZACION
DE LOS EMBRIONES

METODOS	MINUTOS
a.- Caja de Petri	14
b.- Filtro Em Con *	15
c.- Pipeta Volumétrica Modificada *	20
d.- Jeringa de Vidrio *	22
e.- Embudo de Separación *	22
f.- Tubo de Centrifuga *	23
g.- Tubo de Ensaye de 35 ml *	25
h.- Probeta Cilíndrica *	30
i.- Probeta Cónica *	30
j.- Tubo de Ensaye de 120 ml *	35

*

Incluye el tiempo de sedimentación de los embriones en los métodos indirectos, más el tiempo de la búsqueda de éstos.

CUADRO No. 4

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS PORCENTAJES
DE RECUPERACION

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón de Varianza
Entre los Grupos	4.010	9	0.446	22.731 ⁺
Dentro de los Grupos	0.599	40	0.015	--
TOTAL	4.610	49	--	--

⁺ Se encontró una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$)

CUADRO No. 5

PRUEBA DE TUKEY PARA LOS PORCENTAJES
DE RECUPERACION

METODOS DE COLECTA	COMPARACION	DIFERENCIA	MDH = 0.307
(10-8)	0.978-0.970	0.008	X
(10-1)	0.978-0.712	0.266	X
(10-6)	0.978-0.704	0.274	X
(10-7)	0.978-0.576	0.402	SI
(10-5)	0.978-0.500	0.478	SI
(10-9)	0.978-0.376	0.602	SI
(10-3)	0.978-0.260	0.718	SI
(10-2)	0.978-0.208	0.770	SI
(10-4)	0.978-0.152	0.826	SI
(8-1)	0.970-0.712	0.258	X
(8-6)	0.970-0.704	0.266	X
(8-7)	0.970-0.576	0.394	SI
(8-5)	0.970-0.500	0.470	SI
(8-9)	0.970-0.376	0.594	SI
(8-3)	0.970-0.260	0.710	SI
(8-2)	0.970-0.208	0.762	SI
(8-4)	0.970-0.152	0.818	SI
(1-6)	0.712-0.704	0.003	X
(1-7)	0.712-0.576	0.136	X
(1-5)	0.712-0.500	0.212	X
(1-9)	0.712-0.376	0.336	SI
(1-3)	0.712-0.260	0.456	SI
(1-2)	0.712-0.208	0.504	SI
(1-4)	0.712-0.152	0.560	SI
(6-7)	0.704-0.576	0.128	X
(6-5)	0.704-0.500	0.204	X
(6-9)	0.704-0.376	0.328	SI
(6-3)	0.704-0.260	0.444	SI
(6-2)	0.704-0.208	0.496	SI
(6-4)	0.704-0.152	0.552	SI

CONTINUACION DEL CUADRO No. 5

METODOS DE COLECTA	COMPARACION	DIFERENCIA	MDH = 0.307
(7-5)	0.576-0.500	0.076	X
(7-9)	0.576-0.376	0.200	X
(7-3)	0.576-0.260	0.316	SI
(7-2)	0.576-0.208	0.368	SI
(7-4)	0.576-0.152	0.424	SI
(5-9)	0.500-0.376	0.124	X
(5-3)	0.500-0.260	0.240	X
(5-2)	0.500-0.208	0.292	X
(5-4)	0.500-0.152	0.348	SI
(9-3)	0.376-0.260	0.116	X
(9-2)	0.376-0.208	0.168	X
(9-4)	0.376-0.152	0.224	X
(3-2)	0.260-0.208	0.052	X
(3-4)	0.260-0.152	0.108	X
(2-4)	0.208-0.152	0.056	X

X = Estadísticamente iguales.

SI = Estadísticamente diferentes.



FIGURA 1. A

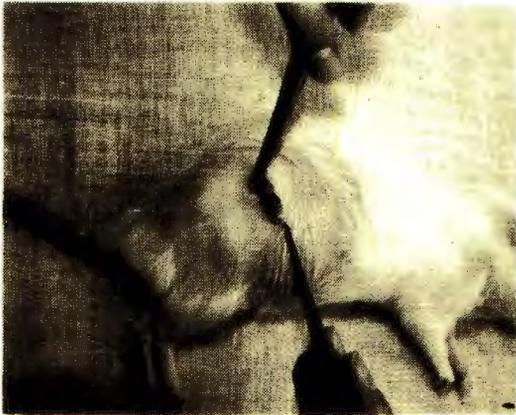


FIGURA 1. B



FIGURA 1. C

FIGURAS 1.A,B y C.
Método quirúrgico para
la obtención de embri-
ones. •

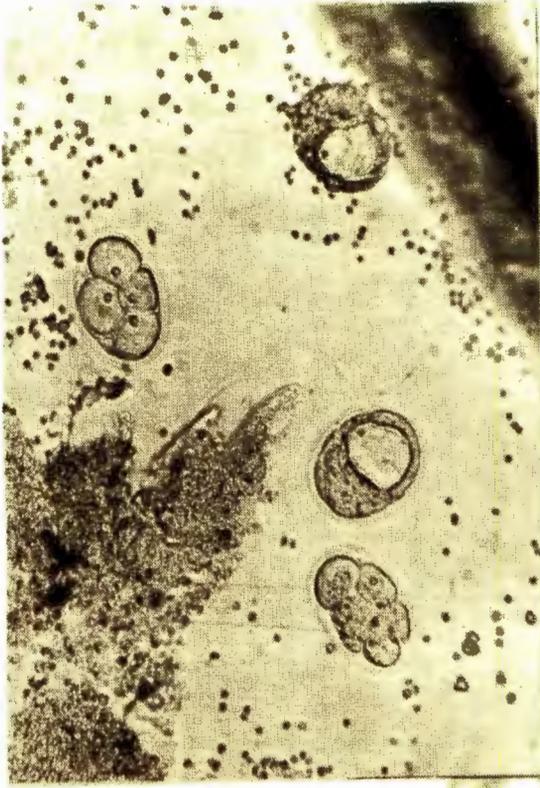


FIGURA 2. A
Medio de perfusión recién
colectado en donde se ob-
servan embriones en dife-
rentes estadios de desa-
rrollo y detritos celula-
res.

FIGURA 2. B
Embriones en el esta-
dio de blastocisto u-
tilizados en el pre-
sente trabajo.





FIGURA 3. A
Solución salina fosfatada de Dulbecco (PBS), (LAB. GIBCO).



FIGURA 3. B
Suero de ternera con el cual se suplementó la solución PBS (LAB. MICROLAB).



FIGURA 3. C
Tubo de centrifuga de 50 ml.

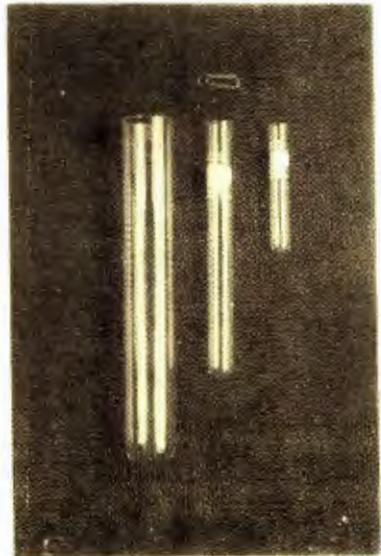


FIGURA 3. D
Tubos de ensayo de 5, 35 y 120 ml.

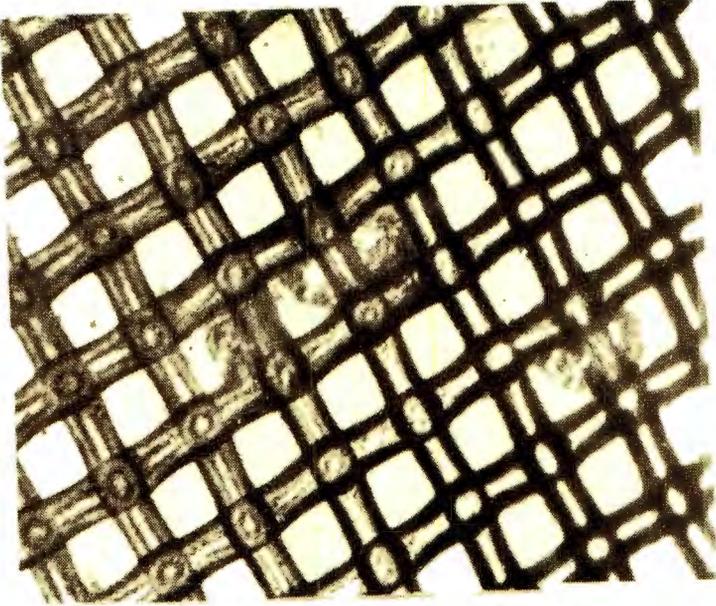


FIGURA 4. A

Embriones en estado de blastocisto contenidos en el filtro hecho con malla de plancton.



FIGURA 4. B

Deformación del filtro comercial Em Con después de haber sido esterilizado en autoclave.

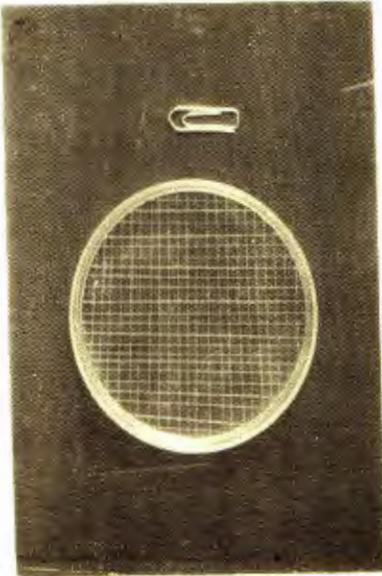


FIGURA 5. A

Caja de Petri grande (8.5 X 1.3cm).



FIGURA 5. B

Filtro comercial marca Em Con.



FIGURA 5. C

Caja de Petri chica (3.3 X 1.0cm).

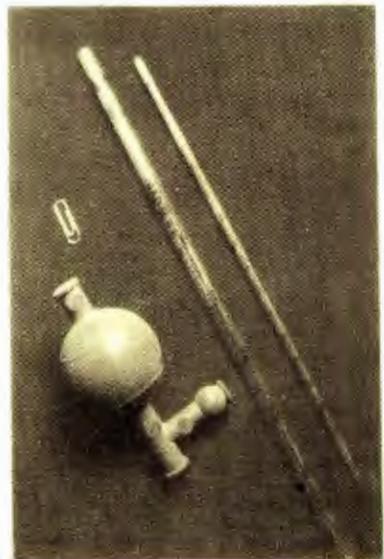


FIGURA 5. D

Propipeta y pipetas graduadas
de 1 y 10 ml.

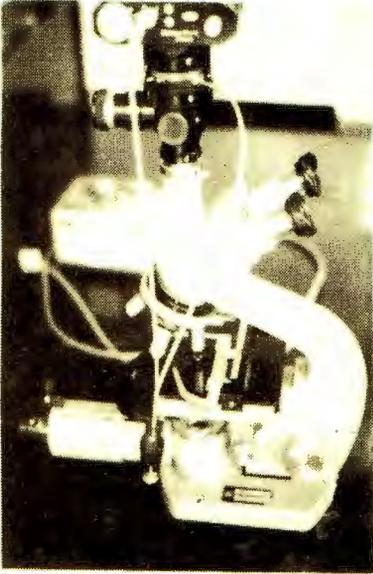


FIGURA 6. A

Microscopio de contraste de fase
con cámara integrada (Olympus, Tokyo).

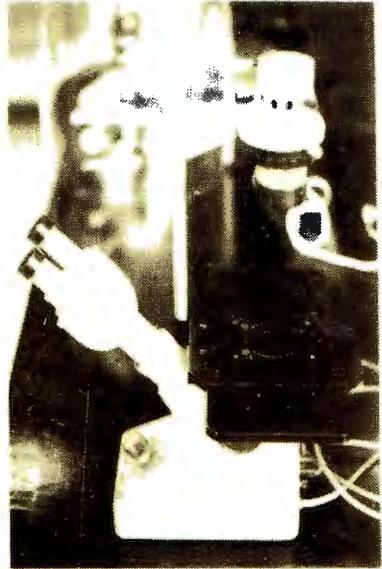


FIGURA 6. B

Microscopio invertido (Olympus, Tokyo).

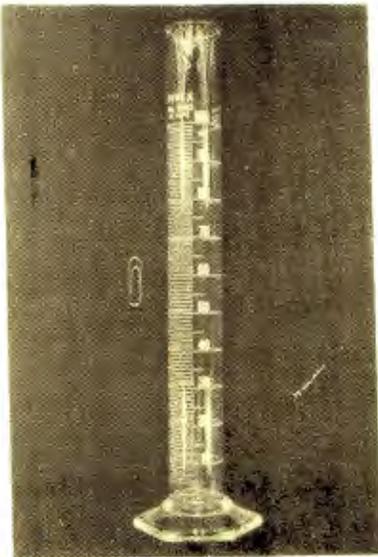


FIGURA 6. C

Probeta cilíndrica de 100 ml.

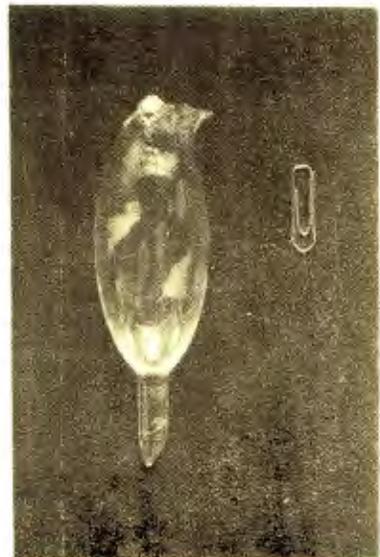


FIGURA 6. D

Pipeta volumétrica modifi-
cada de 45 ml.

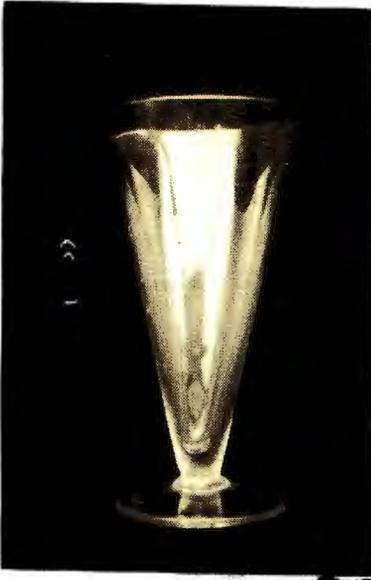


FIGURA 7. A
Probeta cónica de 125 ml.

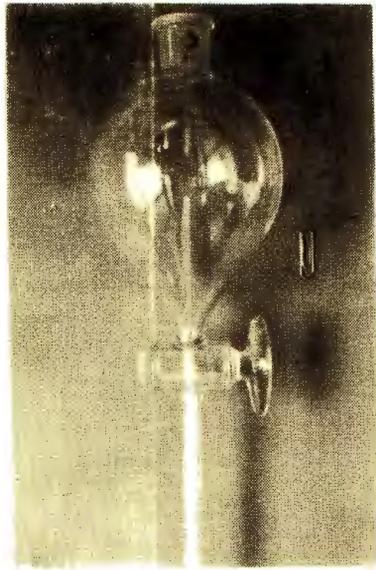


FIGURA 7. B
Embudo de separación de 500 ml.

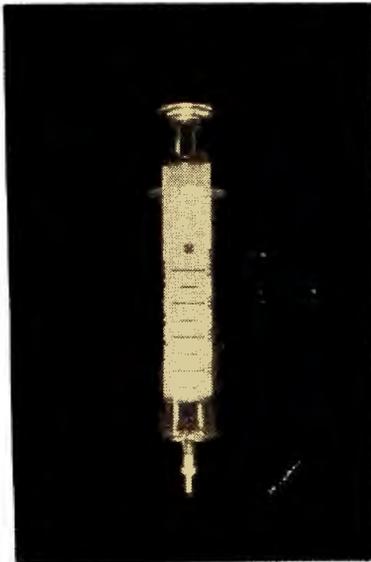
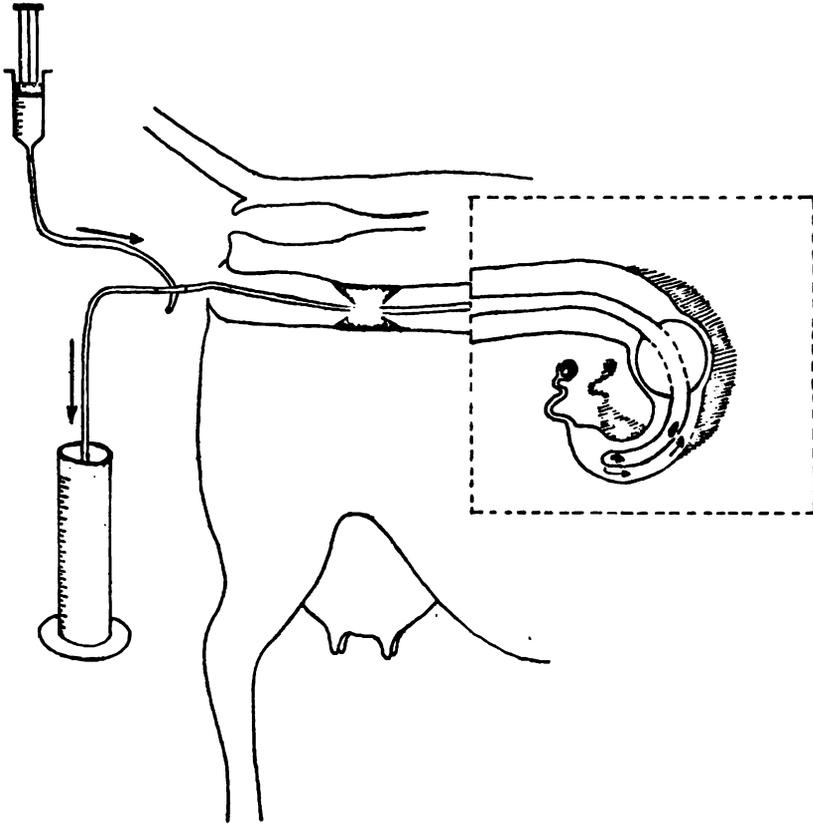


FIGURA 7. C
Jeringa de vidrio de 50 ml.



FIGURA 7. D
Forma en que se colocaron algunos de los métodos de precipitación, con la finalidad de permitir la sedimentación de los embriones.

FIGURA No. 8



Procedimiento de lavado y colección de embriones, con una ampliación del cuerno uterino para indicar la colocación del catéter de Foley.