



111
2-eg

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores "CUAUTITLAN"

ATLAS DE EMBRIONES EN ESTADO DE PREIMPLANTACION

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a

MARIO ALBERTO NIETO AVILA



DIRECTORES: MVZ. SERGIO CORTEZ HUERTA
BIOL. J. RAUL ASTIAZARAN YBARRA

CUAUTITLAN IZCALLI EDO. DE MEX.

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 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.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
a). Generalidades	2
b). Antecedentes	3
c). Estructuras embrionarias	3
d). Desarrollo embrionario	6
e). Transporte embrionario	8
f). Desarrollo embrionario comparado	9
g). Malformaciones embrionarias	10
MATERIAL Y METODOS	
a). Obtención de embriones	12
b). Método y análisis fotográfico	13
c). Método de clasificación de los embriones ...	13
RESULTADOS	
a). Características morfométricas de los estadios normales de preimplantación en embriones de rata Wistar	14
b). Secuencia fotográfica	16
DISCUSION	60
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	63

R E S U M E N

El estudio de la morfología de los embriones normales en las etapas de preimplantación, así como sus anormalidades, es de vital importancia tanto para la Medicina Veterinaria como para la Medicina humana, en las áreas en que se estudian las diferentes técnicas embrionarias, en donde se manejan estos estadios, por ejemplo: la transferencia, el cultivo y microcirugía de embriones y fertilización in vitro, principalmente.

El objetivo del presente trabajo, es el de elaborar un atlas fotográfico embrionario de los estadios de preimplantación, con la finalidad de que este material sirva de base y apoyo a todas aquellas personas que se encuentren trabajando en áreas afines.

En la elaboración del presente estudio, se obtuvieron un total de 1300 embriones aproximadamente, en diversas etapas del desarrollo, provenientes de 180 ratas Wistar. A estos embriones, después de haber sido colectados, se les realizaron estudios fotográficos y morfométricos, dando como resultado una secuencia de 21 láminas compuestas de un total de 144 fotografías representativas de todas las etapas normales de preimplantación embrionarias, así como de sus anormalidades.

Los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, se compararon con los reportados en la literatura para otras especies de mamíferos domésticos y de laboratorio, encontrándose esencialmente solo diferencias en cuanto a tamaño embrionario, ya que en el aspecto morfológico las variaciones son mínimas.

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

a). Generalidades.

Uno de los aspectos de mayor importancia en las técnicas de manipulación embrionaria (transferencia, cultivo in vitro, fertilización, microcirugía, etc.), es la evaluación morfológica de estos (3,5,24).

En la actualidad se pueden usar diversos criterios para tratar de determinar la viabilidad embrionaria, por ejemplo:

- 1). Desarrollo in vitro (9, 26).
- 2). Desarrollo in vivo (17)
- 3). Consumo de glucosa (6,23,24).
- 4). Consumo de aminoácidos (24).
- 5). Actividad enzimática (24).
- 6). Tinciones fluorescentes (19).
- 7). Análisis cinematográfico (18).
- 8). Morfometría y ultraestructura (2,5,9,20).
- 9). Aberraciones cromosómicas (15).
- 10). Eclosión del blastocisto in vitro (18,29).
- 11). Consumo de oxígeno (6,10).
- 12). Análisis morfológico (5,8,9,26).

Con excepción del análisis morfológico, los métodos arriba mencionados revisten serias limitaciones en cuanto al tiempo, costo y equipo para poderse llevar a cabo.

Shea (26), menciona en relación con la transferencia de embriones, que si se pudiera relacionar la morfología con la calidad de estos, se conseguiría un mayor porcentaje de gestaciones (9,28).

Sin embargo, hay que hacer notar que la morfología del embrión, nos da una idea global pero no específica sobre su viabilidad, ya que se ha visto que embriones de morfología atípica pueden llegar a dar crías normales (9,26).

Existen otras características ajenas a la viabilidad del embrión que son importantes para que este pueda implantarse en el lumen uterino de una hembra receptora, y estos factores son: el manejo, calidad, alimentación, estado de salud del animal, etc., así como la habilidad y experiencia del técnico en la manipulación del embrión durante el programa de transferencia (26).

b). Antecedentes.

Uno de los primeros trabajos en que se habla de morfología embrionaria, es el realizado por Gregory en 1930 (7), en el que describe los estadios de preimplantación del conejo, precisando los tiempos de ovulación, segmentación, diferenciación y transporte embrionario.

Posteriormente en 1946, Hamilton (12), describió los estadios tempranos del embrión de bovino. En 1961, Hafez (8) publicó un interesante trabajo sobre las anomalías estructurales y del desarrollo del embrión de conejo y más recientemente, se ha dado énfasis a los aspectos morfológicos del blastocisto de bovino su perovulado (5,16,26), así como a trabajos de ultraestructura (2,21).

c). Estructuras embrionarias.

En general, todos los embriones de mamíferos hasta ahora estudiados, muestran características notablemente similares en sus primeros estadios de desarrollo (13,22).

Las principales estructuras de un embrión son las siguientes:

1). Corona radiada. En la parte más externa del ovocito, existe una envoltura de células foliculares alargadas, radialmente dispuestas, que constituyen la llamada corona radiada. Los embriones de vaca, oveja, zarigüella y humano carecen de esta envoltura, en cambio es particularmente evidente en el caso de ratón, conejo y carnívoros (11,13,14,22,26).

2). Zona pelúcida. Hacia el interior de la corona radiada en el

ovocito, se encuentra una membrana de aspecto hialino y formada - por mucopolisacáridos, llamada zona pelúcida (11,21,22). Esta membrana desde el punto de vista práctico es de mucha importancia, ya que sirve como punto de referencia para la localización e identificación de los embriones en el medio de colecta. Dentro de las funciones más importantes de la zona pelúcida tenemos (11,14,22, 30):

- Evitar la polispermia.
- Permitir la compactación de los blastómeros en desarrollo.
- Impedir el ingreso de leucocitos al interior del embrión.
- Proteger de traumatismos al embrión durante su descenso por la región tubárica.
- Impide la implantación del embrión en regiones extrauterinas.
- Evita la quimerización (agregación) con otros embriones, en animales de ovulación múltiple.
- mantenimiento de la osmolaridad.

En un estudio realizado por Rottman en 1981 (25), se demostró la importancia de la zona pelúcida en el desarrollo, al evaluar - el grado de implantación de embriones de ratón y conejo liberados de ella artificialmente.

Una característica particular del embrión de conejo, es la - presencia en la parte externa de la zona pelúcida de una capa de mucina adquirida durante su trayecto por el oviducto (11).

3). Espacio perivitelino. Se conoce con este nombre a la separación existente entre la zona pelúcida y la membrana vitelina. Antes de la fecundación no se distingue un límite entre ellas, sin embargo, momentos después de la fertilización, se comienza a desarrollar este espacio, como consecuencia de una contracción que sufre el citoplasma ovular durante este proceso (14,15,22).

4). Membrana vitelina. Es la primera envoltura del óvulo y corresponde propiamente a la membrana citoplasmática que proviene del endurecimiento de la periferia del citoplasma ovular (14).

5). Corpúsculos polares. Son células de talla muy reducida, con escasa cantidad de citoplasma, pero con idéntica información genética que el ovocito, y se forma durante las divisiones meioticas o de maduración de este (4,10,13,14,21,23,26,27).

El volumen de los corpúsculos es a menudo muy pequeño comparado con el del ovocito. En el caso de los mamíferos, no obstante, poseen un tamaño aceptable. Así por ejemplo, en el ratón representa un cuarto del volumen total del óvulo (14,15).

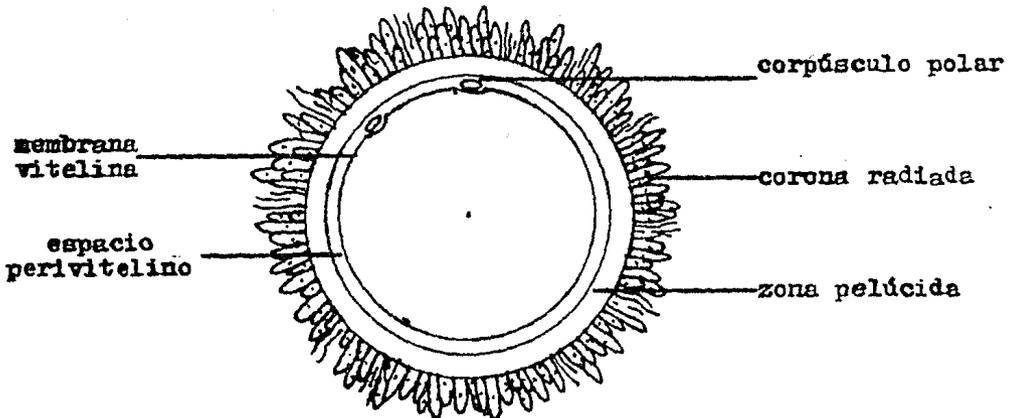


Figura 1. Ovocito después de ser fecundado

d). Desarrollo embrionario.

1). Fecundación.

Durante la ruptura del folículo ovárico se libera el ovocito que a su vez, poco antes ha desarrollado su primer glóbulo polar. Libre ya, el ovocito queda envuelto por las células de la granulosa que se tornan parcialmente mucilaginosas y cuyo conjunto forma la corona radiada, bajo la cual se haya la zona pelúcida. El ovocito al llegar al primer tercio del oviducto, será fecundado por los espermatozoides que se encuentran a ese nivel y que gracias a sus enzimas acrosomales atraviesan las membranas ovulares. Esto produce la activación del óvulo que entonces completa la segunda meiosis, liberando un nuevo corpúsculo polar (4,10,14,21,23,26, - 27).

2). Segmentación.

La división de la célula-huevo inicial, o segmentación, es una consecuencia de la fecundación. Se inicia con la primera división y da lugar a dos células hijas o blastómeros.

La segmentación no se lleva a cabo de una forma totalmente sincrónica, pues entre las fases embrionarias de 2,4 y 8 células, se pueden encontrar estadios transitorios de 3,5,6 y 7 células. Estas divisiones son de tipo mitótico (4,10,11,13,15,22,27).

En el óvulo fecundado, la relación núcleo-citoplasma está profundamente alterada debido a la importancia del citoplasma ovular. El resultado final de la segmentación aproxima dicha relación nucleoplasmática al valor normal propio de la especie considerada (10,11,13,22).

A medida que aumenta el número de blastómeros, las divisiones se hacen menos sincrónicas y se va incrementando el grado de compactación celular, formándose de esta manera lo que se conoce como mórula.

Algunos investigadores prefieren considerar al estadio de mórula como aquel en el que el número de células es de 32 o más, pero en algunas especies, es difícil contar el número de blastómeros después del estadio de 8 células, sobre todo en especies con blastocistos pequeños como en la rata, ratón y hamster, en los que se puede ver la formación de blastocelo cuando hay menos de 16 blastómeros, por esto, es conveniente considerar como mórulas a aquellos embriones que contengan más de 8 células sin espacio alguno en su interior (4,10,11,15,21,27).

3). Formación del blastocisto.

En la mórula de muchas especies, incluyendo oveja, cabra y cerda, pequeñas células que se dividen activamente, pueden ser vistas agrupadas en uno de los polos, y células grandes con bajo índice mitótico en el otro. Subsecuentemente, las células pequeñas se aplanan, se produce una deslaminación entre los blastómeros pequeños y grandes, formándose una cavidad que se conoce con el nombre de blastocelo. Las células pequeñas se sitúan hacia la periferia y las grandes hacia el centro. Finalmente, la segmentación del embrión de mamífero conduce a la formación del blastocisto que comprende dos conjuntos celulares con destino muy distinto:

- El trofoblasto o trofoectodermo, en la periferia, origen de parte de los anexos embrionarios y que participa especialmente en la formación de la placenta.

- La masa celular interna o botón embrionario, que es el conjunto de células bajo el trofoblasto, que corresponde a los territorios organoformadores del embrión (1,10,11,13,15).

En la rata, la compactación celular comienza a presentarse en el estadio de 8 células, aunque los embriones de otros mamíferos como el conejo y algunos carnívoros, tienen un mayor número de células cuando la cavidad del blastocisto se hace aparente (1,11, - 15).

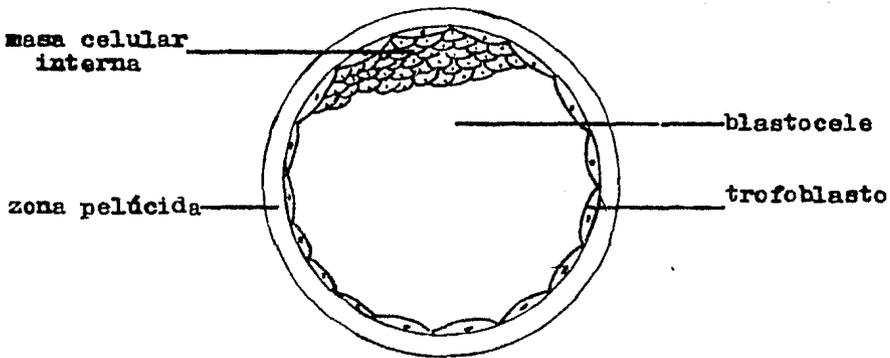


Figura 2. El blastocisto

Al continuar el desarrollo, el blastocisto se va expandiendo gradualmente en virtud del crecimiento de su cavidad blastocélica ocupando el máximo espacio bajo la zona pelúcida, llegando el momento en que esta no puede contenerlo y se abre dejándolo libre.

Ya eclosionado, el blastocisto continúa su crecimiento, denominándose entonces blastocisto elongado, y es en esta fase del desarrollo cuando el embrión está listo para implantarse en el lúmen uterino (21,23).

e). Transporte embrionario.

El movimiento del embrión a través del oviducto y su llegada al útero, se lleva a cabo en forma cronológicamente distinta en cada especie (tablas 1 y 2). En el ratón y en la rata por ejemplo, el óvulo se mueve en pocos minutos hacia la porción más dilatada del oviducto (ampolla), en donde permanece por algunas horas. En animales como el ratón, en los que el transporte del huevo es relativamente rápido, la mórula avanzada o el blastocisto temprano, entran al útero en la mañana del tercer día, encontrándose en la

tarde del mismo día, solo blastocistos en el lumen uterino. En la rata, el transporte embrionario, toma un día más que en el ratón (11).

f). Desarrollo embrionario comparado.

Tabla 1. Fases del desarrollo en mamíferos domésticos. Tiempos - aproximados dados en días después de la ovulación (10).

animal	2 cel	8 cel	entrada al útero	blastocisto	nacimiento
vaca	1-1.5	2.5	4	7-8	284
oveja	1-1.5	2	3	5.5-6	150
sabra	1.5	3	3.5	6-7	150
cerda	1-1.5	3-4	2-2.5	5-6	112
yegua	1	3	4-6	-	135

Tabla 2. Fases del desarrollo en mamíferos de laboratorio. Tiempos aproximados dados en días después de la ovulación (11).

animal	2 cel	4 cel	16 cel	blastocisto	implantación
rata+	2 y 3	3t	4t	5	5t
ratón+	2	2m	3t	4m	5m
conejo++	2	2t	3m	3t	7
cuyo+	2	4	5	5t	6
hamster+	2	3	4m	4	5
macaco	2	3m	3t	5	9

+ Especies con ovulación espontánea: día uno es el de la detección de espermatozoides en vagina.

++ Especies con ovulación inducida: día 1 es a las 24 hs. después del coito.

m- mañana t- tarde

Tabla 3. Dimensión del ovocito en algunos mamíferos. Diámetro en micras(14).

animal	diámetro
vaca	160
yegua	135
perra	140
coneja	120-130
gata	120-130
mona	110-120
rata	75-96
ratón	75
mujer	125-135

g). Malformaciones embrionarias.

Ciertas anomalías en el desarrollo embrionario durante los estadios de preimplantación, han sido descritas por varios autores (5,8,9,10,11,13,26).

Siendo la fecundación un fenómeno tan complejo, no puede por menos que presentar un gran número de anomalías. Entre las más importantes podemos encontrar:

- polispermia. Penetración de espermatozoides supernumerarios, aunque en la rata, ratón y conejo es hasta cierto punto común observar a uno o más espermatozoides en el interior del espacio perivitelino sin que penetren en el citoplasma oviductario.
- Genogénesis. Activación del ovocito por un espermatozoide que no participó en el proceso de fecundación, iniciándose consecuentemente la segmentación con un número de cromosomas haploide.
- Androgénesis. Participación del pronúcleo masculino, pero no del femenino en la segmentación.
- poliploidía. Fracaso de la segunda meiosis en el ovocito y consecuente participación de dos pronúcleos femeninos en la segmentación.

Estas anomalías, probablemente se vean aumentadas con la edad del óvulo (11,15).

Hafez (8,9), describe algunas malformaciones en embriones de conejo, entre las que se incluyen: Exceso de células sanguíneas, burbujas de aire e irregularidades en la capa de mucina, persistencia de la corona radiada después de 48 horas, ruptura de la zona pelúcida, blastómeros de forma angular, mórulas en forma de lenteja, granulaciones citoplasmáticas, anomalías en la pigmentación del citoplasma, fragmentación, embriones en forma de casco, ríñon, amiba, oval, "cabeza de martillo" o paramecio.

En el caso de óvulos fecundados, la morfología puede variar desde cercana a la normal, hasta la de un elevado grado de degeneración.

El signo más claro de falta de fertilización, es el fracaso en la segmentación. Estos embriones generalmente dan evidencias de degeneración (26), sin embargo es muy importante diferenciar segmentación de fragmentación, pues los óvulos no fecundados suelen "quebrarse" en varias piezas que dan la apariencia de división celular (8,10,26).

En ovocitos no fecundados extraídos de ovario y oviducto es muy conocida la fragmentación, la cual es muy similar a la que se observa en folículos atrésicos y es más común en óvulos obtenidos de ratas sexualmente inmaduras tratadas con gonadotropinas que en los de adultas (8).

Otras anomalías que se pueden presentar son: polimorfismo, - contacto anormal entre blastómeros (descompactación), blastómeros extruidos, diferencias en el tamaño del embrión, citólisis, retraso en el desarrollo y otras (5,8,26).

En algunos casos, la falta de integración de alguno o algunos blastómeros, puede dar lugar a mórulas o blastocistos más pequeños, pero que sin embargo pueden llegar a desarrollarse en forma normal (26).

a). Obtención de embriones.

Se obtuvieron aproximadamente 1300 embriones de un total de 180 ratas Wistar de 3 meses de edad.

La recuperación de los diversos estadios embrionarios se hizo tomando en cuenta la cronología del desarrollo embrionario mencionada en la tabla 2.

Se colocó a las hembras con machos fértiles en proporción de dos a uno y se consideró como día uno de embarazo el de la detección de espermatozoides en vagina.

El método de colecta de los embriones fué el siguiente:

Se sacrifica al animal por medio de dislocación cervical. se hace antisépsia de la región ventral utilizando una solución diluida de benzal (1:1000), para posteriormente exponer el aparato reproductor mediante una incisión en V que descubre completamente la cavidad abdominal.

Posteriormente se procede a hacer la dissección de los oviductos y cuernos uterinos, depositandolos en una solución salina estéril para después perfundir el oviducto en su región fimbriada, utilizando aguja del número 27 y pinzas de relojero. Este último paso se hizo con el auxilio de un microscopio estereoscópico (45X) con el fin de facilitar la maniobra.

El medio de perfusión utilizado fué una solución de fosfatos de Dulbecco estéril, suplementada con glucosa (1g/lt), piruvato de sodio (0.028 g/lt), penicilina (100 U.I./ml) y suero de rata (20%).

Con 1-2 ml de medio es suficiente para perfundir completamente el órgano. El líquido de perfusión se colectó en vidrios de reloj para su posterior observación al microscopio.

Todo el material de vidrio utilizado se siliconizó previamente

te empelando una solución acuosa de silicón al 1%.

Las operaciones de colecta y traslado de embriones se realizaron con una pipeta Pasteur cuya punta tiene un diámetro aproximado de 150 micras, ayudándose para esto de un microscopio invertido.

b). Método y análisis fotográfico.

Los embriones seleccionados, se colocaron en un portaobjetos para posteriormente ser fotografiados (cámara integrada Olympus Tokyo), empleando un microscopio de contraste de fase, a un aumento de 240X, excepto las fotografías de la lámina I que fueron tomadas a 120X. Se utilizó película Kodak panatomic-x, FX-135, --asa 32/16 din., para impresiones en blanco y negro.

c). Método de clasificación de los embriones.

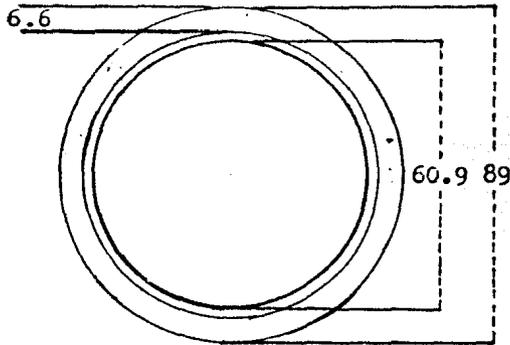
Las características morfológicas consideradas para la clasificación de los embriones fueron:

- | | |
|---------------|--|
| Zona pelúcida | 1. ESFERICIDAD, fisuras. |
| Embrión | 2. FORMA GENERAL, regularidad. |
| | 3. ESTRUCTURAS VISIBLES, blastómeros, trofoblasto, masa celular interna, blastocela. |
| | 4. OPACIDAD. |
| Células | 5. ESTADO DE AGREGACION DE LAS CELULAS, - aspecto de los contornos celulares. |
| | 6. VARIACION DEL TAMAÑO ENTRE LAS CELULAS. |
| | 7. RESTOS CELULARES DENTRO DEL ESPACIO PERIVITELINO. |
| | 8. INTEGRIDAD DE LAS CELULAS, presencia - de vacuolas, dispersión de material celular, granulaciones en la superficie. |

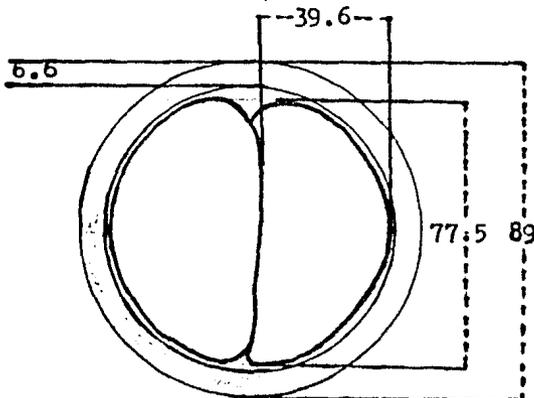
R E S U L T A D O S

A continuación se presentan las características morfométricas, así como la secuencia fotográfica (144 fotografías en 21 láminas) de los embriones de rata Wistar, en sus etapas de preimplantación, colectados para la elaboración de este trabajo.

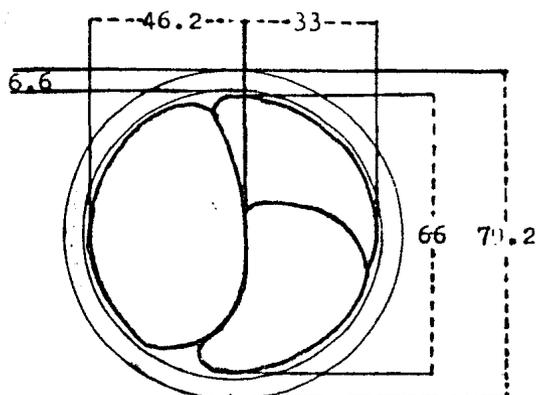
a). Características morfométricas de los estadios normales de preimplantación en embriones de rata Wistar (micras).



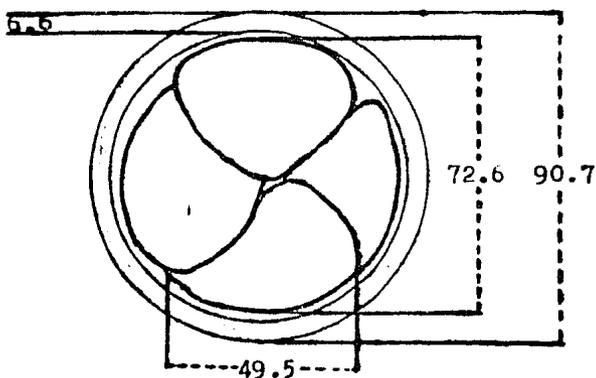
Cigoto, colectado en la tarde del primer día de gestación.



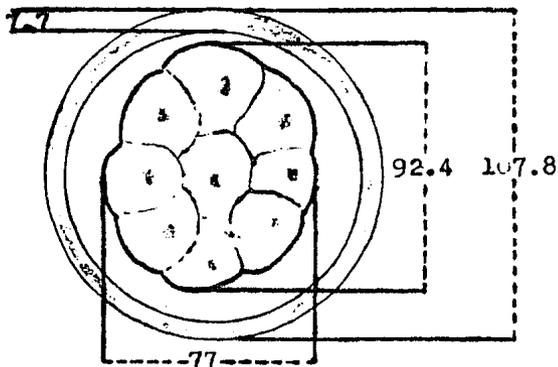
Embrión de dos células, colectado en la mañana del segundo día de gestación



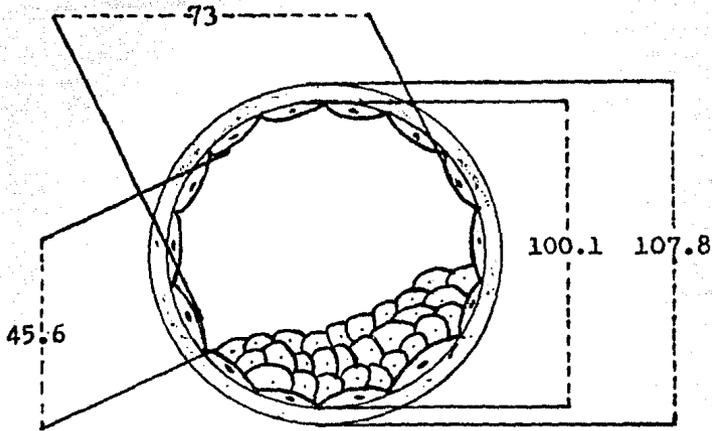
Embrión de tres células, colectado en la tarde del segundo día de gestación



Embrión de cuatro células, de la tarde del tercer día de gestación



Embrión de 8 células, de la noche del cuarto día de gestación.



Blastocisto, colectado en la mañana del quinto día de gestación

b). Secuencia fotográfica.

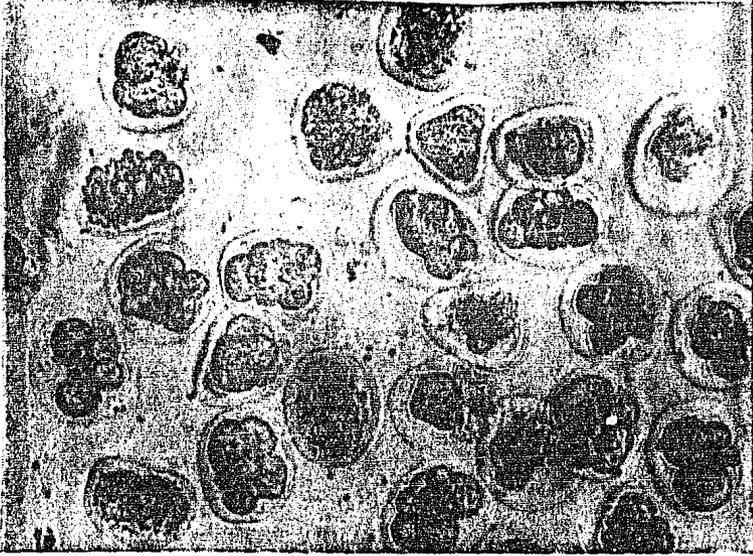
Se presentan a continuación un total de 144 fotografías, integradas en 21 láminas, que ilustran todos los estadios de pre-implantación embrionarios normales así como sus más comunes malformaciones.

Lamina I:

1,2. Malformaciones embrionarias (120 X).

LAMINA I
300 μ m

NIETO
ASTIAZARAN

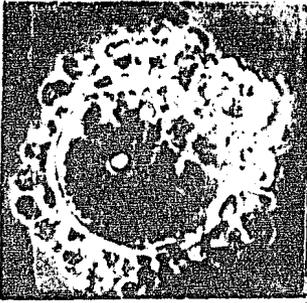


Lamina II: Estadios de preimplantación de morfología normal.

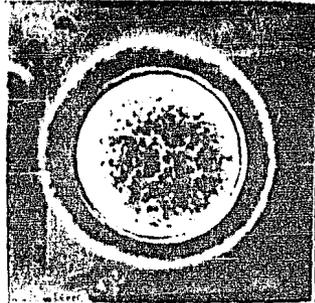
1. Ovocito cubierto por células de la corona radiada, colectado por punción del folículo ovárico.
2. Cigoto, colectado en la tarde del primer día de gestación.
3. Embrión de dos células, colectado en la mañana del segundo día de gestación.
4. Embrión de tres células, colectado en la mañana del -tercer día de gestación.
5. Embrión de cuatro células, colectado en la tarde del tercer día de gestación.
6. Embrión de 8 células, colectado en la tarde del cuar-to día de gestación.
7. Mórula colectada en la noche del cuarto día de gesta-ción.
8. Blastocisto, colectado en la mañana del quinto día de gestación.
9. Blastocisto elongado, colectado en la mañana del sexto día de gestación.

LAMINA II
100 μ m

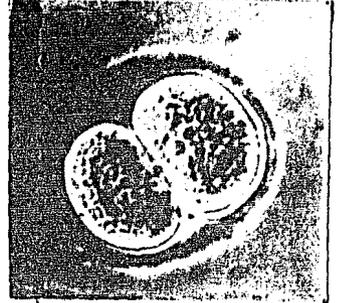
ASTIAZARAN
NIETO



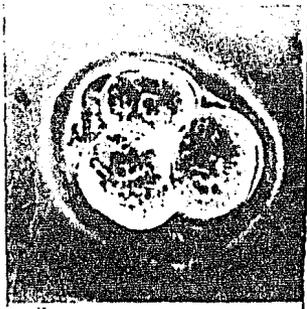
1



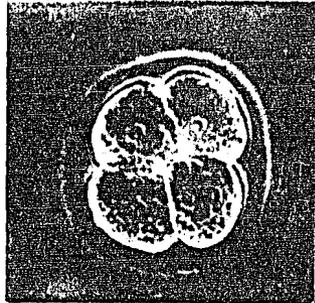
2



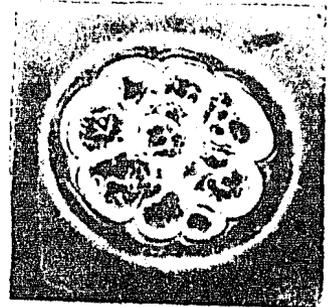
3



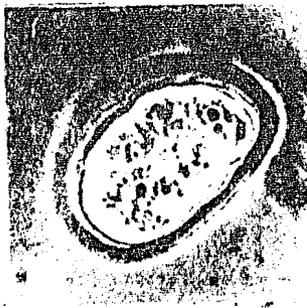
4



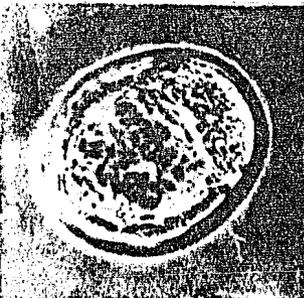
5



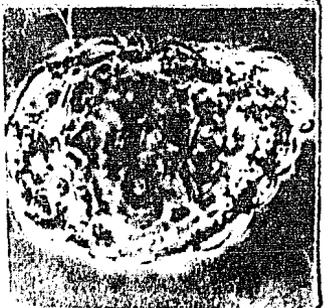
6



7



8



9

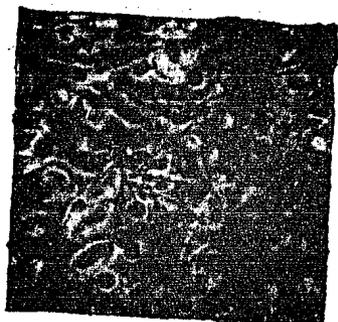
Lamina III: Espermatozoides y ovocitos.

1. Espermatozoides de rata, colectados de la vagina del animal a la mañana siguiente de su estancia con el macho.

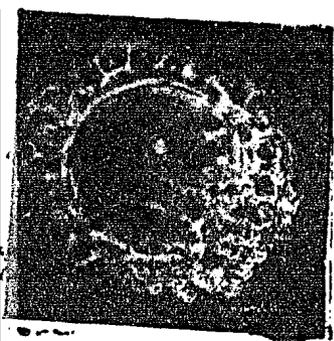
- 2, 3. Ovocitos cubiertos por células de la corona radiada, colectados por punción del folículo ovárico.

LAMINA III
100 μ m

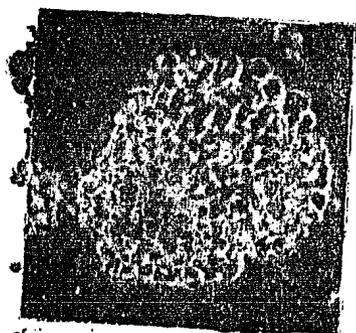
NIETO
ASTIAZARAN



1



2



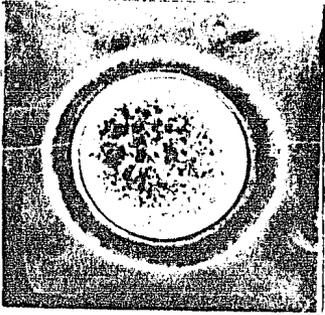
3

Lamina IV: Variaciones morfológicas del estado de una célula, colectado en la tarde del primer día del embarazo.

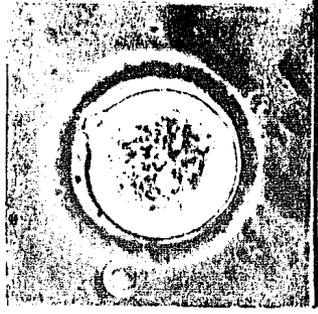
- 1-4. Secuencia de fertilización en donde se observa el cono de fecundación (fotografía 2), y la formación del espacio perivitelino (fotografías 3-4).
5. Embrión con cabeza y cola de espermatozoide y detritos celulares en el interior del espacio perivitelino.
6. Estrangulamiento del embrión por la zona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

LAMINA IV
100 μ m

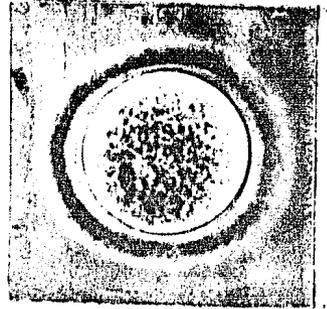
ASTIAZARAN
NIETO



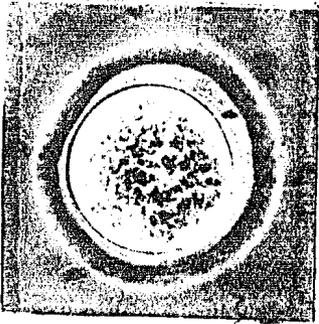
1



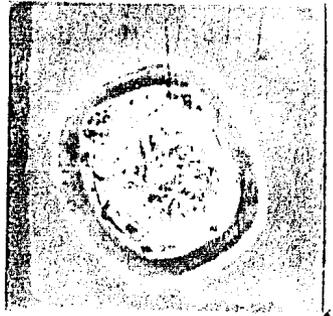
2



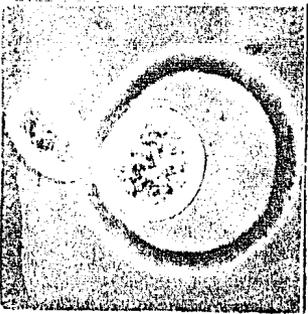
3



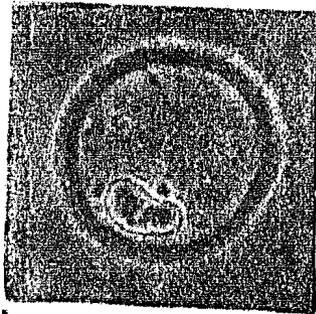
4



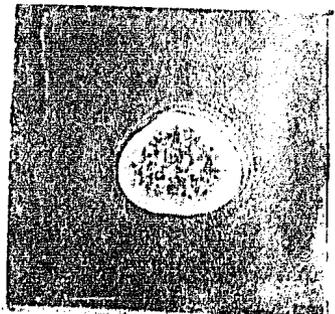
5



6



7



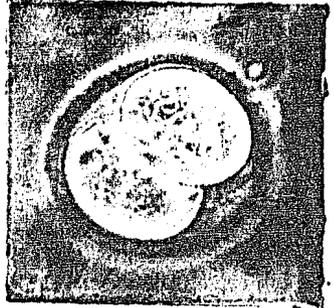
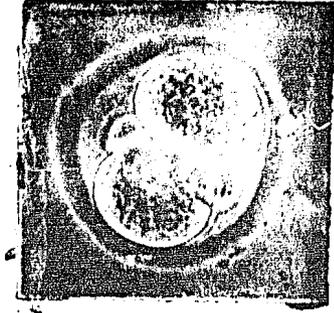
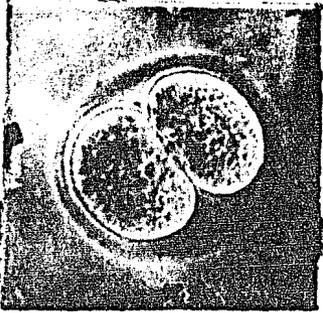
8

Lamina V: Variaciones morfológicas del estadio de dos células, colectados en la mañana del segundo día del embarazo.

1. Embrión de morfología típica.
2. Embrión de dos células con corpúsculos polares.
- 3-5. Embriones normales con blastómeros ligeramente alargados.
- 6-9. Embriones con blastómeros de regularidad variable.

LAMINA V
100µm

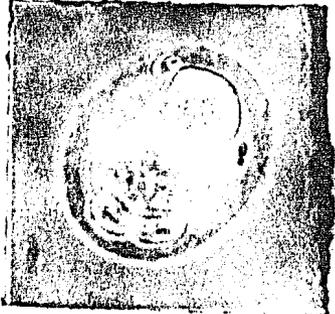
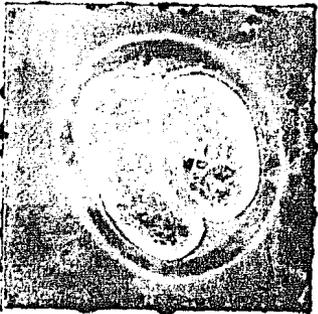
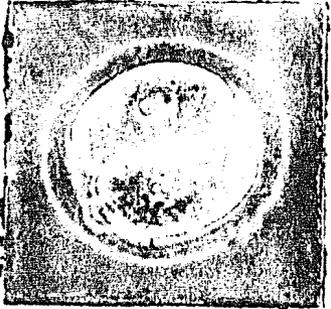
NIETO
ASTIAZARAN



1

2

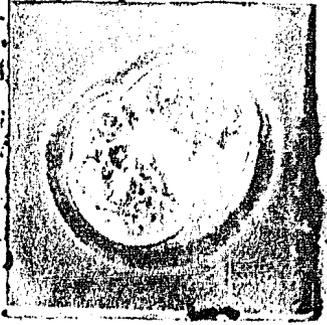
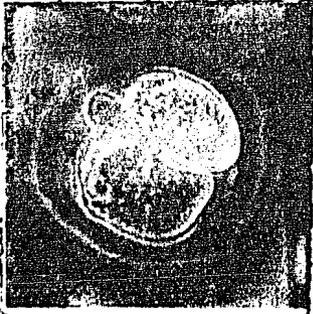
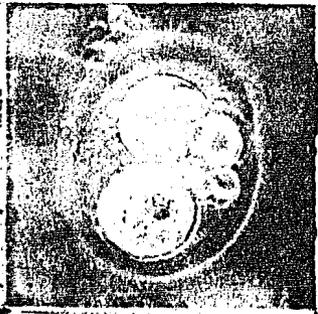
3



4

5

6



7

8

9

Lámina VI: Variaciones morfológicas del embrión de dos células colectados en la mañana del segundo día del embarazo.

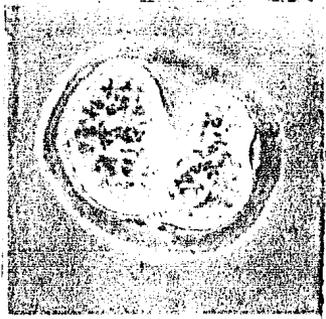
1-4. Embriones con blastómeros de regularidad variable.

5-8. Embriones con un blastómero disuelto.

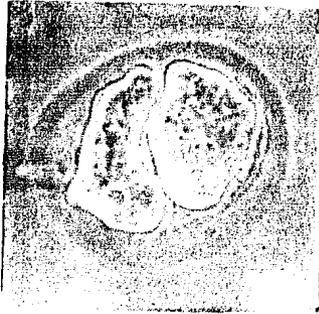
9. Embriones con ambos blastómeros disueltos, en donde se observan además los corpúsculos polares.

LAMINA VI
100 μ m

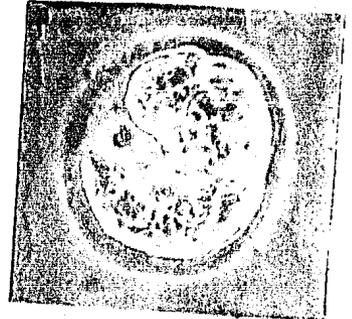
ASTIAZARAN
NIETO



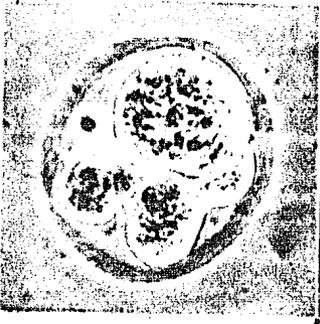
1



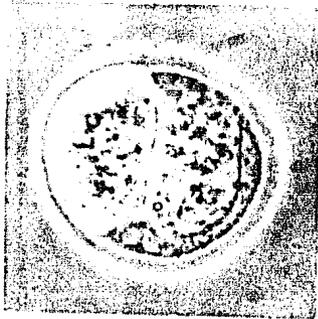
2



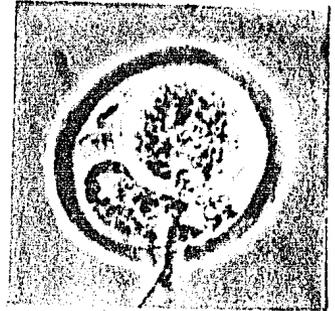
3



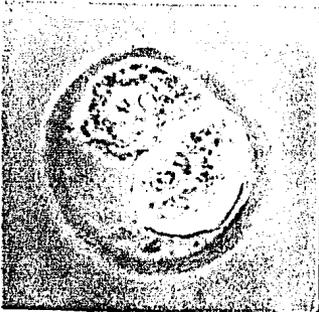
4



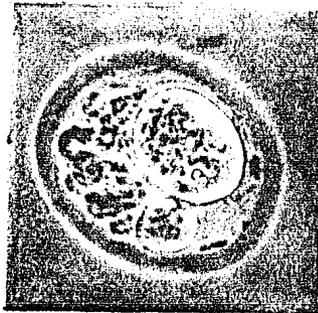
5



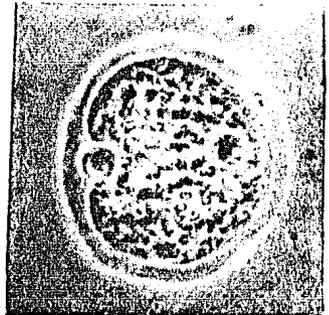
6



7



8



9

Lámina VII: Variaciones morfológicas del embrión de tres células, colectados en la mañana del tercer día del embarazo.

1-3. Embriones de morfología típica.

4, 5. Embriones de morfología variable.

LAMINA VII
100 μ m

NIETO
ASTIAZARAN

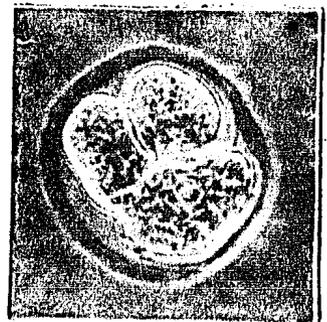
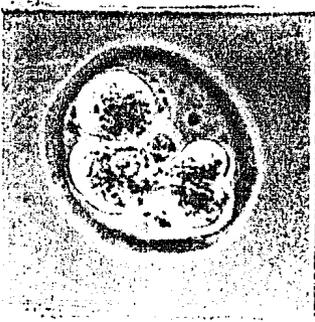
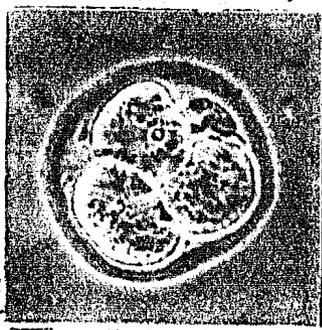
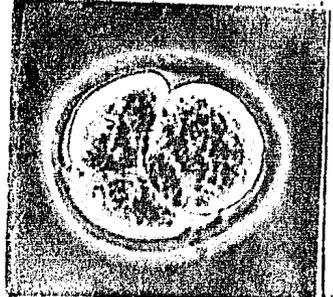
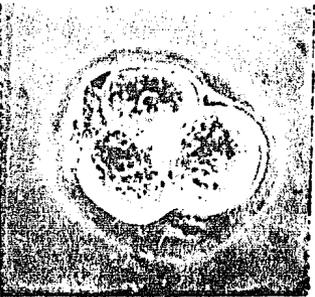
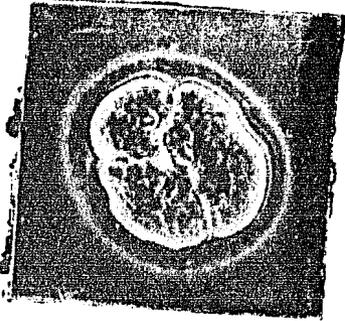


Lámina VIII: Variaciones morfológicas del embrión de tres células, colectados en la mañana del tercer día de embarazo.

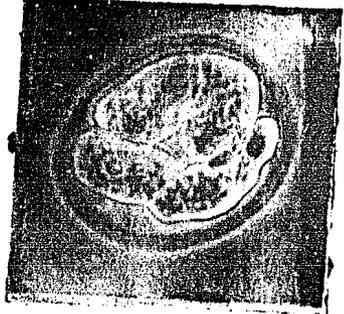
1. Embrión con blastómeros irregulares.
2. Embrión con blastómeros elongados.
3. Embrión con dos blastómeros alargados redeando al tercero.
- 4, 5. Embriones con uno y dos blastómeros disueltos repectivamente.

LAMINA VIII
100 μ m

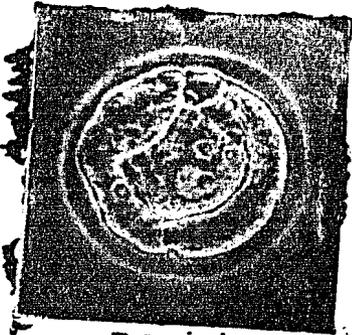
ASTIAZARAN
NIETO



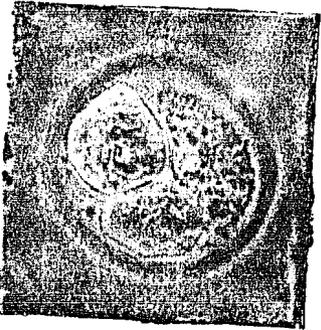
1



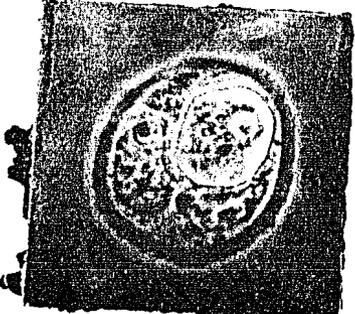
2



3



4



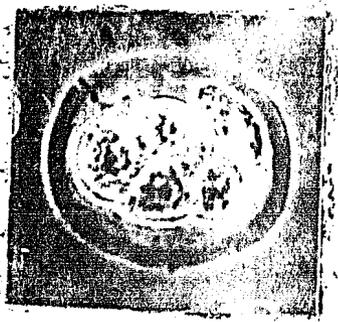
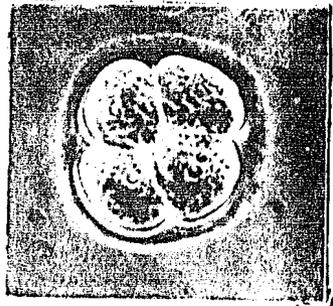
5

Lámina IX: Variaciones morfológicas del embrión de cuatro células, colectados en la tarde del tercer día del embarazo.

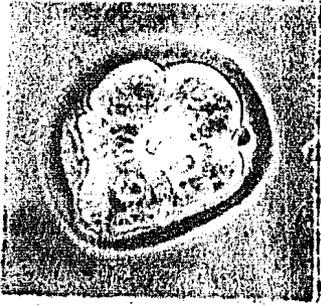
1. Embrión de morfología típica.
2. Embrión chico, con restos celulares en el espacio perivitelino.
- 3, 4. Embriones de morfología variable.

LAMINA IX
100 μ m

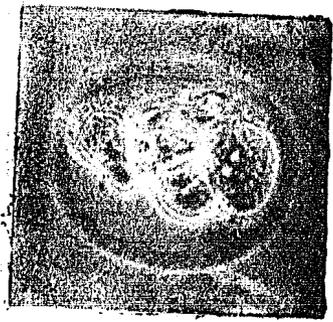
ETO
AZARAN



2



3



4

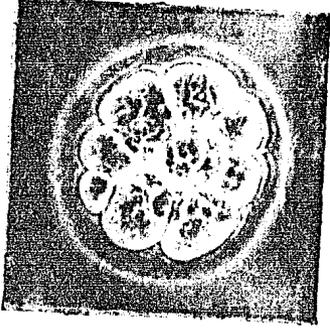
Lámina X: Variaciones morfológicas del embrión de 8 células, colectados en la tarde del cuarto día del embarazo.

1-7. Embriones de morfología típica, con diversos gra - dos de compactación y tamaño.

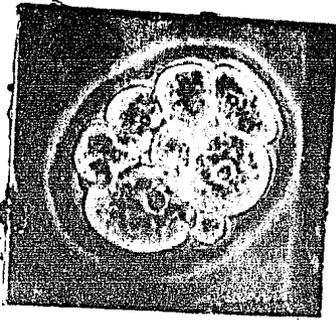
8, 9. Embriones de morfología variable.

LAMINA X
100 μ m

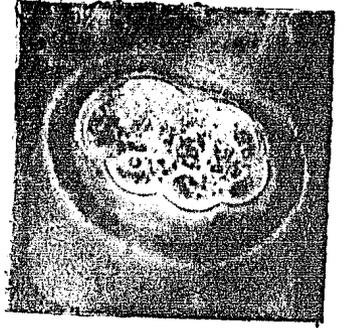
ASTIAZARAN
& NIETO



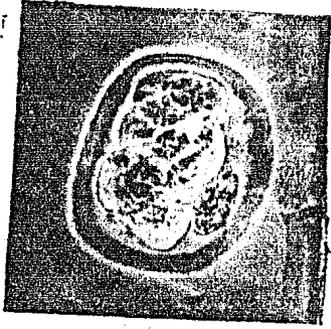
1



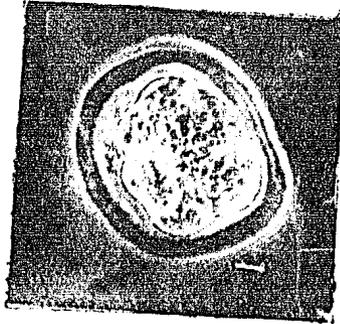
2



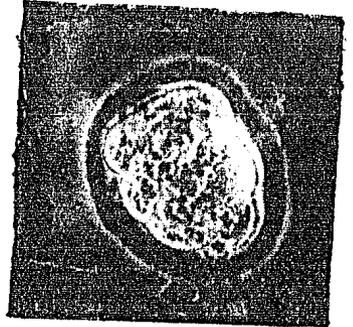
3



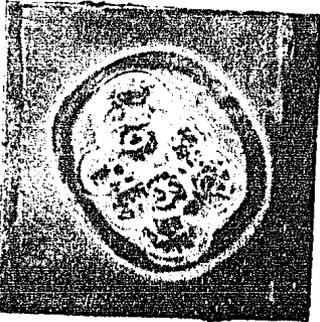
4



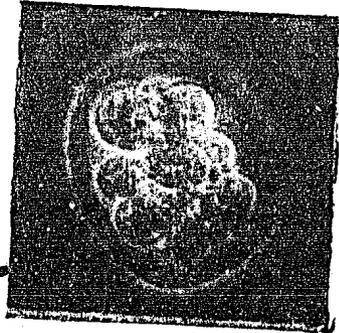
5



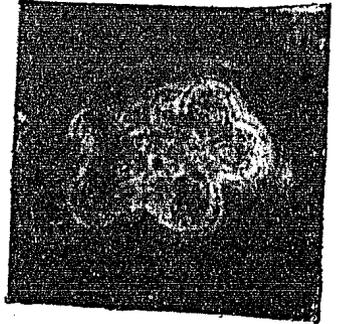
6



7



8



9

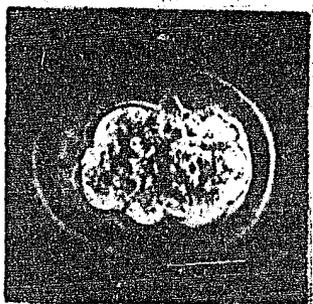
Lámina XI: Variaciones morfológicas del embrión de ocho células, -
colectados en la tarde del cuarto día del embarazo.

1. Embrión de morfología típica.

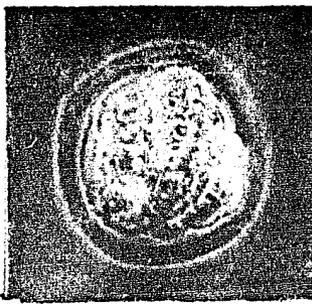
2-9. Embriones degenerados, con diversos grados de opaci -
dad citoplasmática.

LAMINA XI
100 μ m

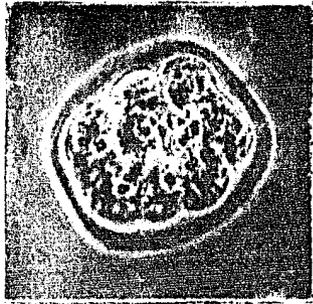
NIETO
ASTIAZARAN



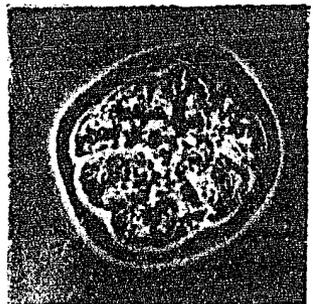
1



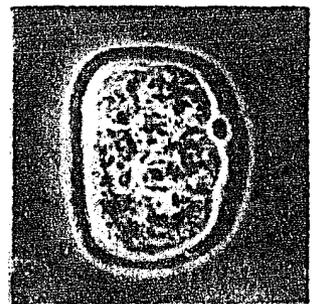
2



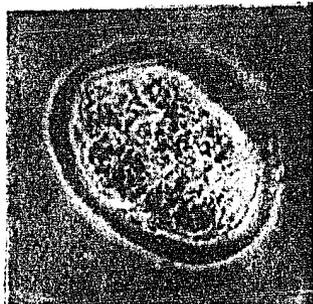
3



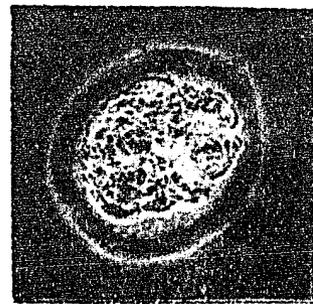
4



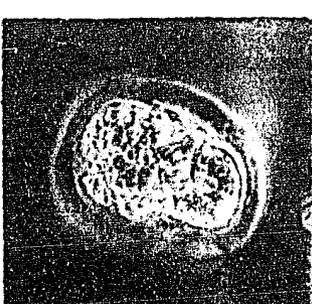
5



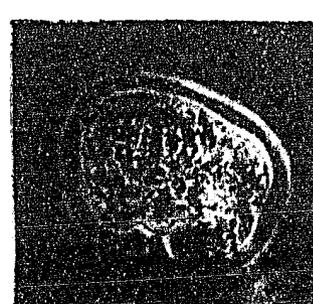
6



7



8



9

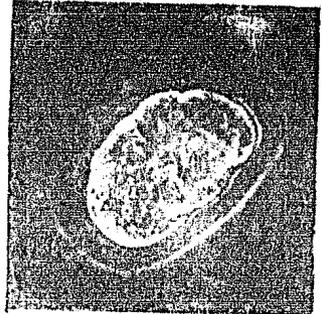
Lámina XII: Variaciones morfológicas del estadio de mórula, colectados en la noche del cuarto día del embarazo.

1-5. Mórulas de morfología típica.

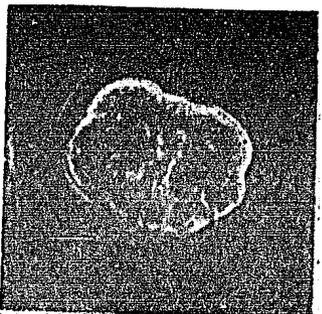
6-8. Mórulas de morfología variable.

LAMINA XII
100µm

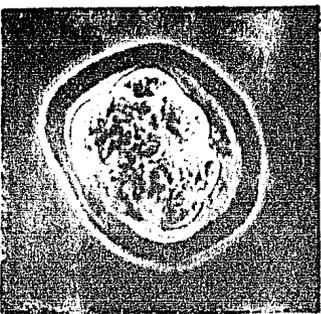
ASTIAZARAN
NIETO



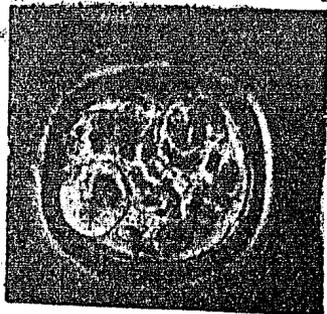
1



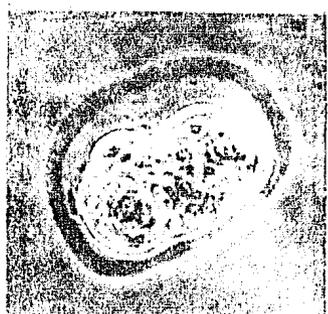
2



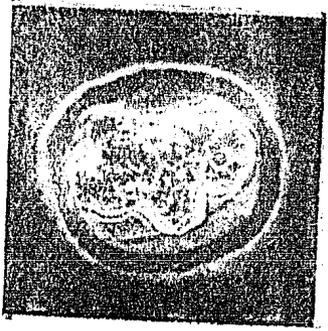
3



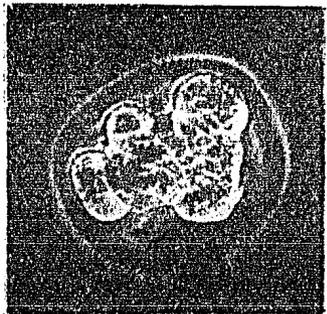
4



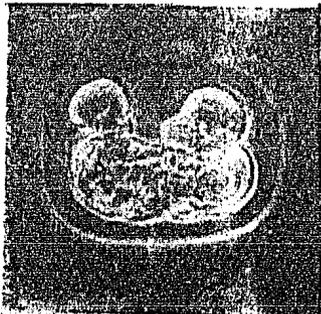
5



6



7



8

Lámina XIII: Variaciones morfológicas del estadio de mórula, co-
lectadas en la noche del cuarto día del embarazo.

- 1-4. Mórulas chicas con restos celulares dentro del espacio perivitelino.
5. Mórula chica con dos blastómeros no integrados.
6. Mórula de aspecto irregular.
7. Mórula degenerada, con zona pelúcida grande y restos celulares en su interior.
8. Mórula descompactada.

LAMINA XIII
100µm

NIETO
ASTIAZARAN

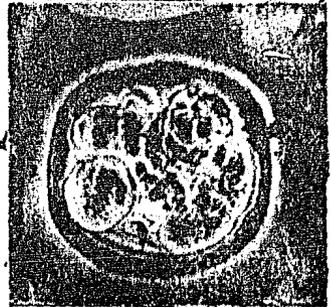
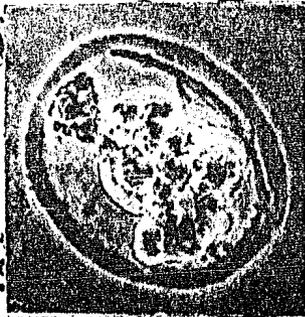
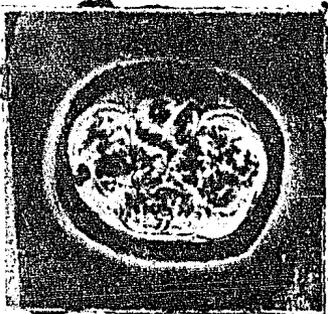
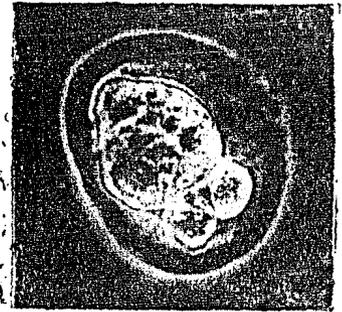
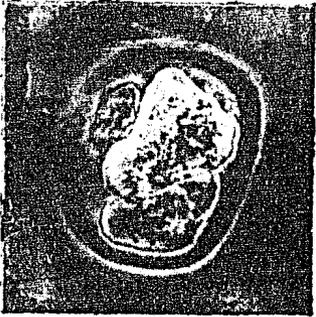
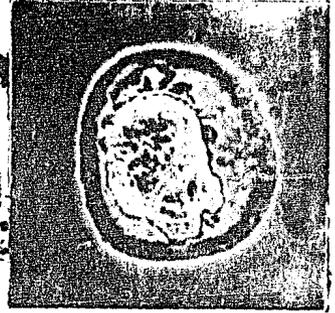
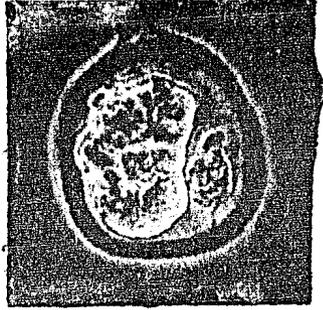
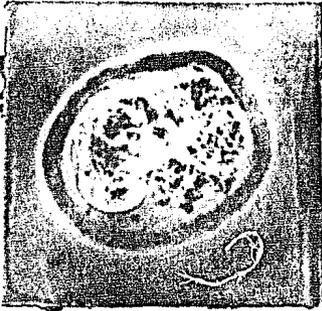
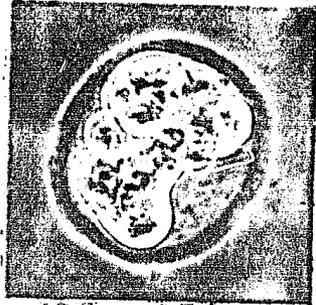


Lámina XIV: Variaciones morfológicas del estadio de mórula, colectadas en la noche del cuarto día del embarazo.

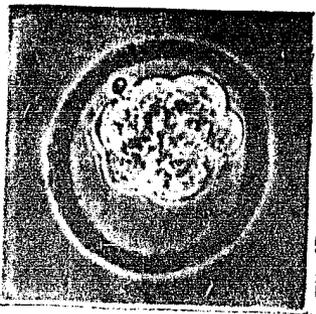
1. Mórula atípica con blastómeros no integrados.
2. Mórula chica.
3. Mórula chica con zona pelúcida alargada.
4. Mórula chica con vesícula en el espacio perivitelino.
- 5-7. Mórulas chicas con restos celulares en el espacio perivitelino.
8. Micromórula con restos celulares en el espacio perivitelino.

LAMINA XIV
100 μm

ASTIAZARAN
NIETO



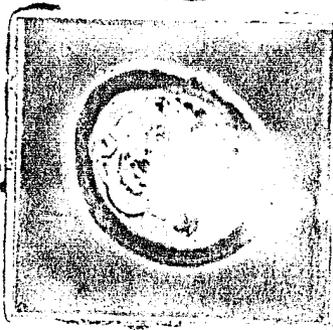
1



2



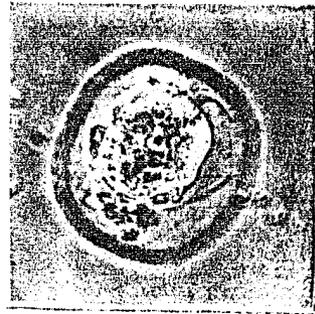
3



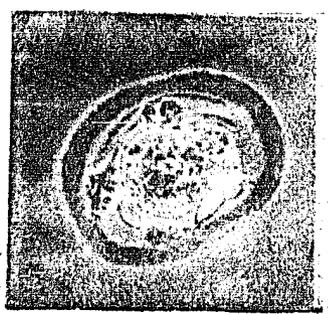
4



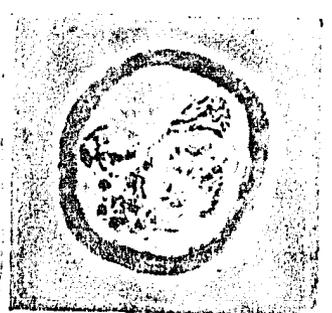
5



6



7



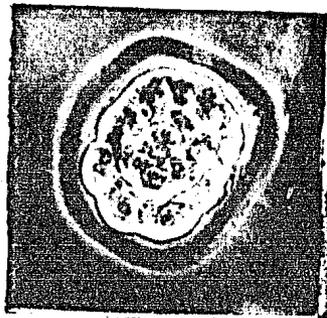
8

Lámina XV: Variaciones morfológicas del estadio de blastocisto, colectados en la mañana del quinto día del embarazo.

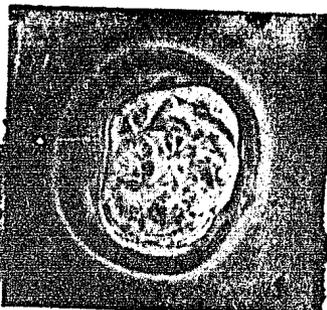
- 1-6. Diversas etapas en la formación del espacio blasto célico.
7. Blastocisto expandido, con un blastómero en forma de vesícula no integrado.
8. Blastocisto expandido.

LAMINA XV
100 μ m

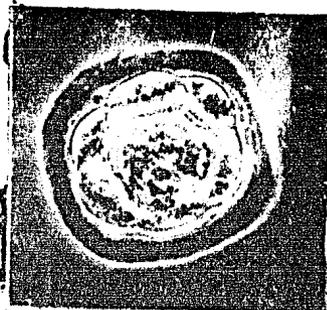
NIETO
ASTIAZARAN



1



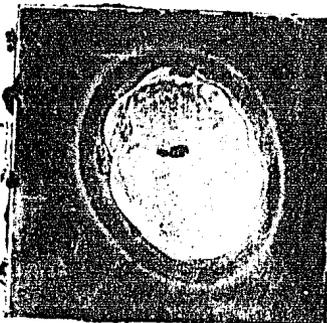
2



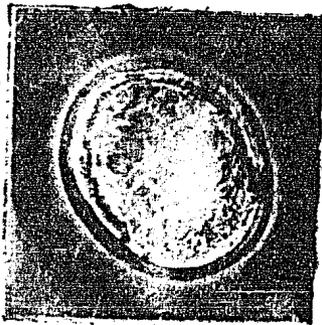
3



4



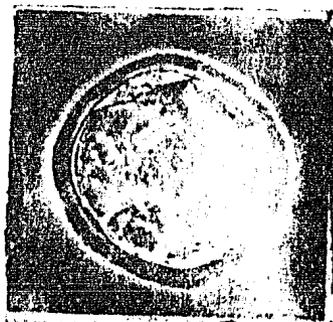
5



6



7



8

Lámina XVI: Variaciones morfológicas del estadio de blastocisto -
elongado (libre de la zona pelúcida), colectados en la tarde
de del quinto y mañana del sexto día del embarazo.

1, 2. Blastocistos elongados, colectados en la tarde del -
quinto día del embarazo.

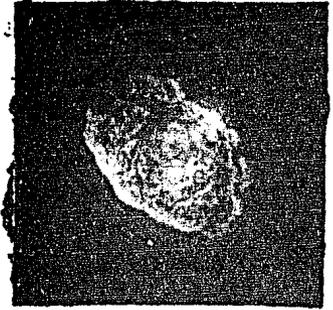
3-6. Blastocistos elongados, colectados en la mañana del -
sexto día del embarazo.

LAMINA XVI
100 μ m

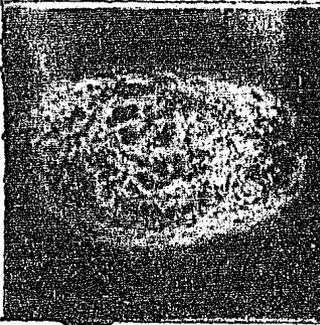
ASTIAZARAN
NIETO



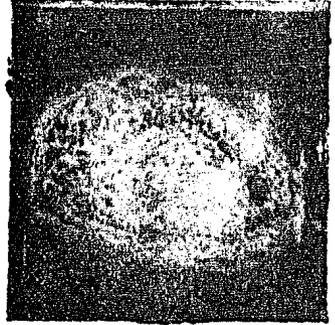
1



2



3



4



5



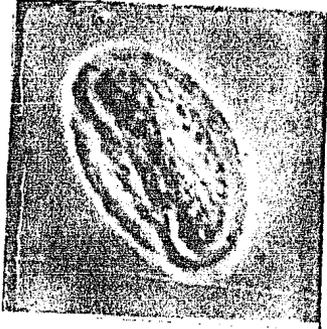
9

Lámina XVII: Embriones degenerados, colectados entre el primero y el quinto día del embarazo.

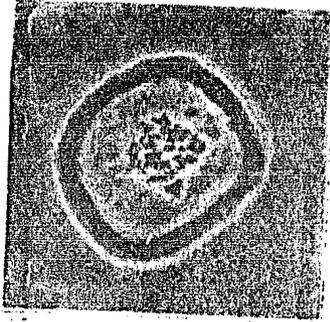
1-8. Zonas pelúcidas conteniendo en su interior diferentes cantidades de material embrionario disuelto.

LAMINA XVII
100 μ m

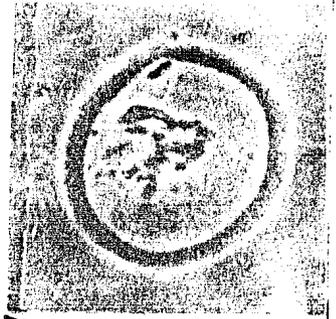
NIETO
ASTIAZARAN



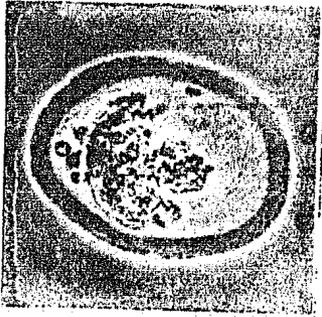
1



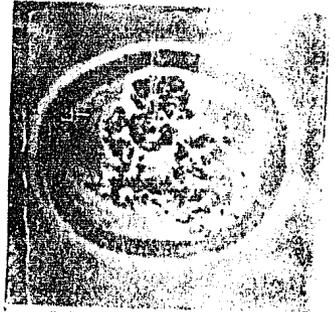
2



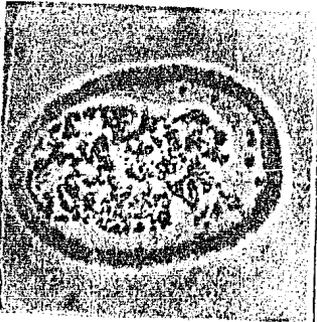
3



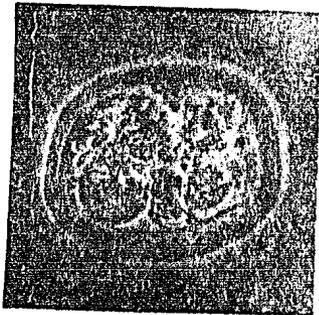
4



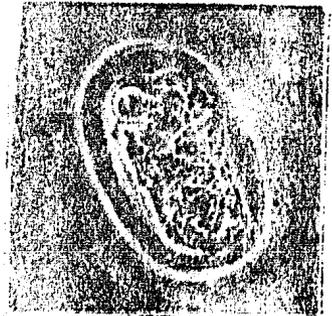
5



6



7



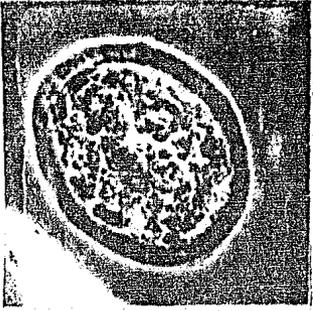
8

Lámina XVIII: Embriones degenerados colectados entre el primero y el quinto día del embarazo.

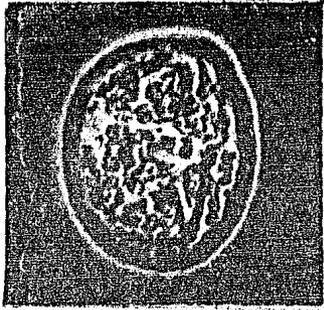
1-8. Zonas pelúcidas conteniendo en su interior diferentes cantidades de material embrionario disuelto.

LAMINA XVIII
100 μ m

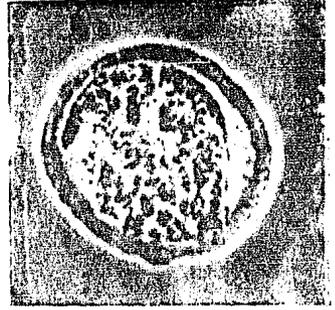
AST. ZARAN
NETO



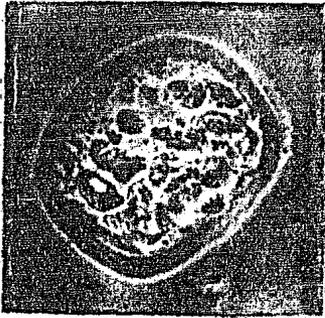
1



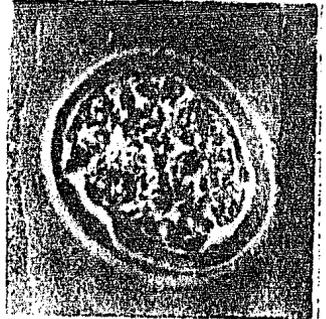
2



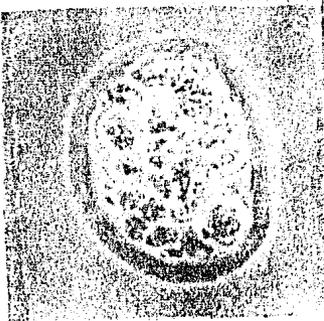
3



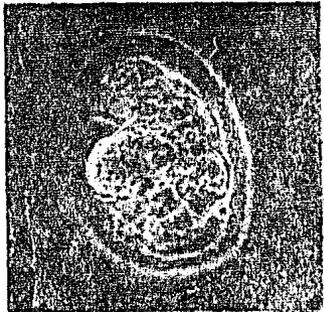
4



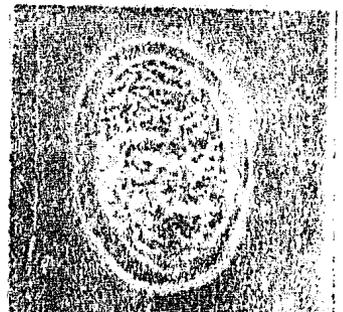
5



6



7



8

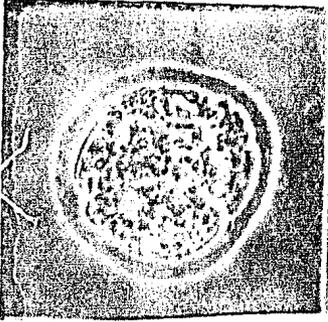
Lámina XIX: Embriones degenerados, colectados entre el primero y - el quinto día del embarazo.

1. Zona pelúcida con material embrionario disuelto en su - interior.

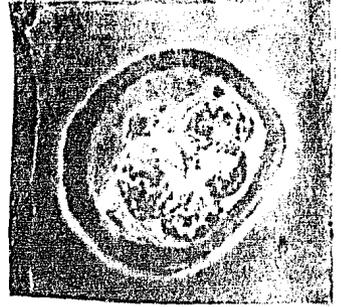
2-7. Embriones degenerados de morfología variable y blastó - meros mostrando un modelo atípico de agregación.

LAMINA XIX
100 μ m

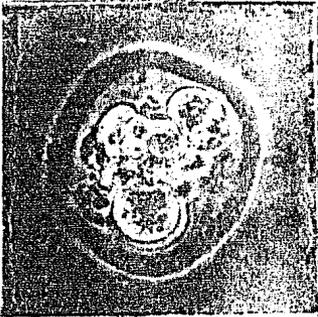
NIETO
ASTIAZARAN



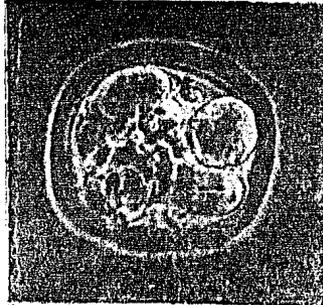
1



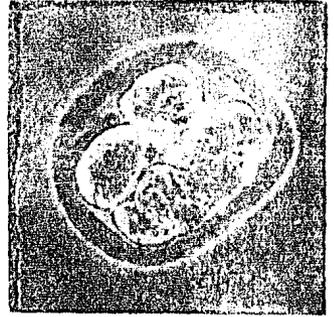
2



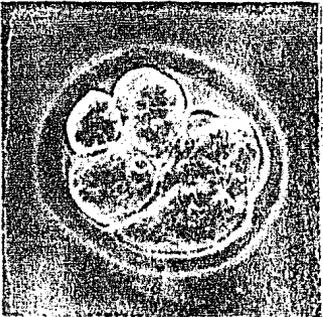
3



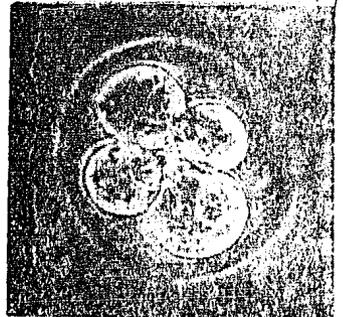
4



5



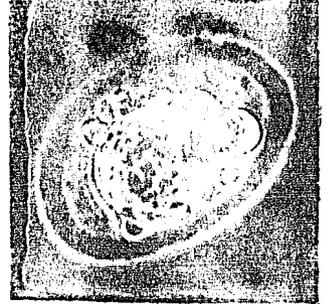
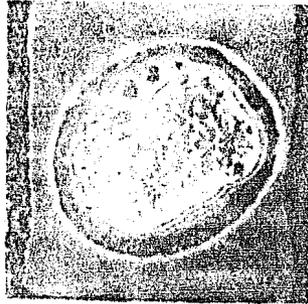
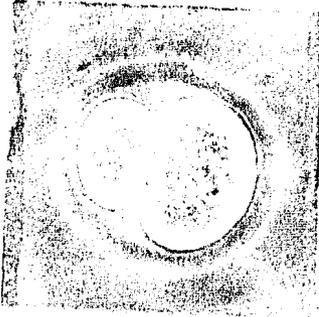
6



7

LAMINA XX
100 μ m

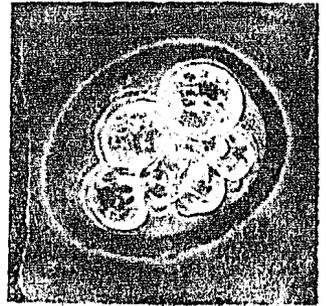
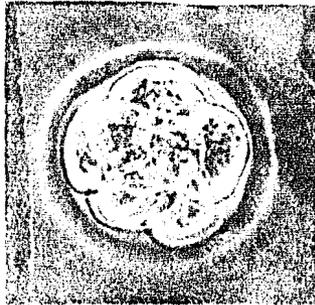
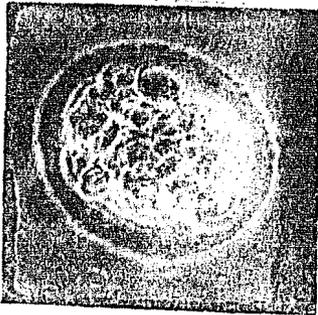
ASTIAZARAN
NIETO



1

2

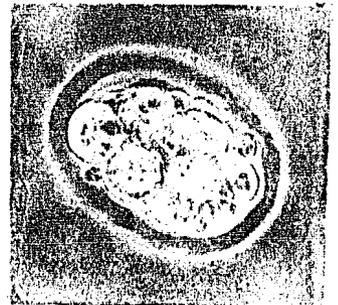
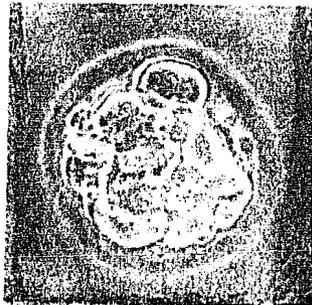
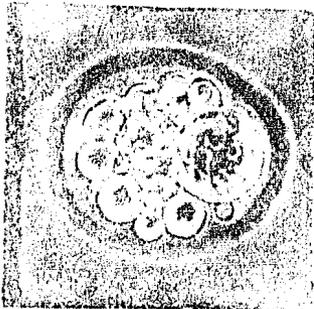
3



4

5

6



7

8

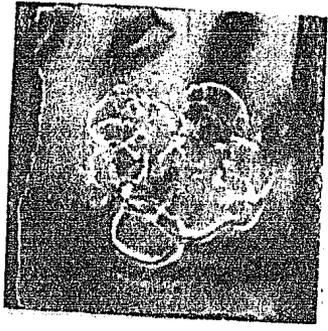
9

Lámina XXI: Ovocitos no fecundados fragmentados, colectados entre el primero y el quinto día del embarazo.

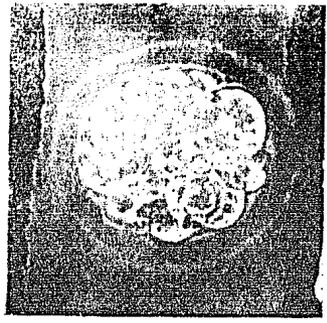
1-9. Ovocitos no fecundados, con diferentes grados de fragmentación.

LAMINA XXI
100 μ m

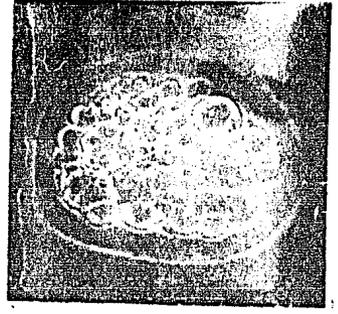
NIETO
ASTIAZARAN



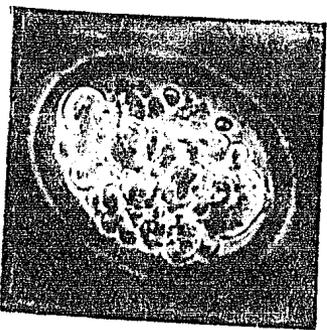
1



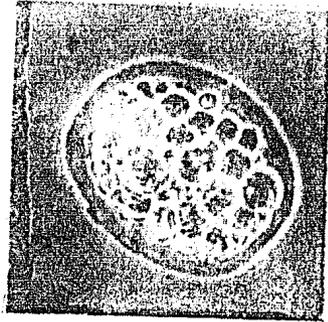
2



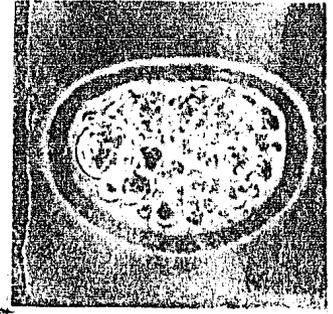
3



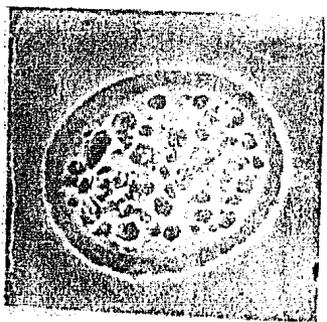
4



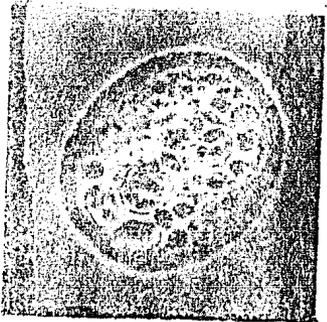
5



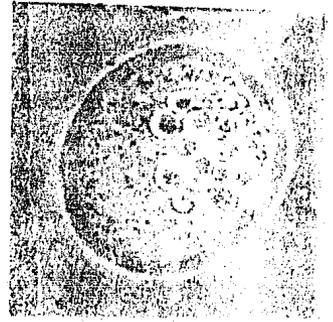
6



7



8



9

Embriones morfológicamente normales:

Lámina II (1-9).
 Lámina IV (1-4).
 Lámina V (1-5).
 Lámina VII (1-3).
 Lámina IX (1).
 Lámina X (1-7).
 Lámina XI (1).
 Lámina XII (1-5).
 Lámina XV (1-8).
 Lámina XVI (1-6).

Embriones con restos de espermatozoides en su interior:

Lámina IV: 5 (cabeza y cola).
 Lámina V: 3 (cabeza).
 Lámina VI: 5 (cola).
 Lámina XI: 2 (cola).
 Lámina XII: 6 (cola), 8 (cabeza).
 Lámina XIII: 8 (cola).
 Lámina XIV: 6 (cola y cabeza), 7 (cola).
 Lámina XVII: 7 (cola).
 Lámina XVIII: 7 (cola).
 Lámina XIX: 4 (cola).

Embriones con blastómeros no integrados:

Lámina XII (7, 8).
 Lámina XIII (4,5,7,8).
 Lámina XIV (1).

D I S C U S I O N

En el transcurso del presente trabajo, se observó que los embriones de rata de la variedad Wistar, sufren de alguna anomalía en una proporción del 20%.

Al comparar dichas malformaciones con las descritas por otros autores (5,8,9,10,11,13,26) para otras especies, se ha observado que tales anomalías pueden ser similares a las que se presentan en rata.

De todas las malformaciones que se registraron, sería muy difícil identificar cual de ellas impediría el desarrollo futuro del 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, ya que un elevado porcentaje de estos, presentan una morfología normal al momento de colectarse.

Los embriones degenerados que se encuentran expuestos en las láminas XVII, XVIII y XIX, y que fueron colectados entre el primero y quinto día de gestación no iban nunca a desarrollarse, y las posibles causas de este degeneramiento podrían ser las mencionadas por Hafez (8), que menciona alteraciones fisiológicas, químicas, genéticas, ambientales y patológicas.

Las fragmentaciones, son el resultado de la no fertilización de los ovocitos, así, cuando no se lleva a cabo este proceso y el ovocito continúa su descenso por la región tubárica, se comienza a fragmentar su citoplasma de manera irregular. La explicación a este fenómeno aun no es bien conocida (8,10,16).

Frecuentemente se podría confundir a un estadio de preimplantación embrionario con un ovocito fragmentado, como en el caso de un embrión de dos células con el ovocito fragmentado de la fotografía 1, lámina IX; o el de una mórula con los ovocitos fragmentados de

las fotografías 2, 3 y 5 de la lámina XX. Sin embargo, con las observaciones constantes llevadas a cabo a lo largo del presente trabajo, ha sido posible discernir entre un tipo de embrión y otro - (esto cuando se presenta un ovocito fragmentado junto con estadios embrionarios normales). Cuando las fragmentaciones se presentan en un 100%, lo cual es muy frecuente, es cuando resulta más sencillo el poder diferenciar entre un embrión normal y un ovocito no fecundado y fragmentado.

Observando la secuencia fotográfica, se podrá notar que las etapas de ocho células y mórula, poseen en su conjunto la mayor variedad de alteraciones morfológicas y esto puede ser debido a que en animales que presentan embriones pequeños (rata, ratón y hamster), el paso del embrión de 8 células (lámina X-1), a mórula y a blastocisto, puede efectuarse dentro del mismo embrión sin que aumente el número de blastómeros, solamente que sus células van a adquirir una apariencia de agregación para dar origen al estadio de mórula (lámina XII-1), y posteriormente comenzar a formar paulatinamente el espacio blastocélico, llegando así a la etapa de blastocisto (lámina XV-1,2).

CONCLUSIONES

Después de haber expuesto lo anterior, se puede llegar a concluir lo siguiente:

- 1). Las variaciones morfológicas así como las degeneraciones embrionarias de la rata, pueden ser similares a las de otras especies de mamíferos.
- 2). Los embriones producidos por una rata Wistar sufren de alguna anomalía en relación del 20% aproximadamente.
- 3). La viabilidad de los embriones con morfología diferente a la típica, solo puede ser observada ya sea por el cultivo de estos en el laboratorio o por su transferencia en animales pseudo-embarazados.
- 4). Los ovocitos no fecundados, tienden hacia la fragmentación.

Los resultados del presente estudio, pueden ser útiles como apoyo a la investigación (Microcirugía, fertilización y cultivo IN VITRO, etc.), a la práctica médica (programas de transferencia de embriones), así como a la enseñanza de la embriología, ya que el conocimiento de los estadios de preimplantación en sus formas típicas y atípicas es importante para el médico, en virtud de los notables avances que día a día se logran en el campo de la Embriología experimental.

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

1. Brinster, R.L.: Embryo development. *J. anim. Sci.*, 38: 1003-1012 (1974).
2. Calarco, P.C. and McLaren, A.: Ultrastructural observations of preimplantation stages of the sheep. *J. Embryol. exp. morph.*, 36: 609-622 (1976).
3. Church, R.B. and Raines, K.: Biological assay of embryos utilizing fluorescein diacetate. *Therio.*, 13: 91 (1980).
4. Fitzgerald, M.J.T.: *Human Embryology. A regional approach*. 1th. ed. Harper & Row, New York 1978.
5. Flechon, J.E., Garnier, V. and Hegman, Y.: Blastographie. Du developpement précoce de l'embryon bovin superovulé. I. N.R.A. (Station Centrale de Physiologie Animale), Jouy - en Josas 1980.
6. Fridhandler, L.: *Biology of gestation*, vol. 1, 1th. ed. N.S. Asalli, Academic Press, New York 1968.
7. Gregory, P.W.: Briefly summarize some of the morphological, - biological and biochemical investigations in the mammalian preimplantation conceptus. *Contr. Embryol.*, 21: 141 (1930).
8. Hafez, E.S.E.: Structural and development anomalies of rabbit ova. *Internat. J. Fertil.*, 6: 394-407 (1965).
9. Hafez, E.S.E.: In vitro and in vivo survival of morphologically atypical embryos in rabbits. *Nature*, 196: 1226-1227 (1962).
10. Hafez, E.S.E.: *Reproductions in farm animals*, 1th. ed. Lea & Febiger, Philadelphia 1962.

11. Hafez, E.S.E.: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. 1th. ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1970.
12. Hamilton, W.J. and Laing, J.A.: Development of the egg of the cow up to stage of blastocyst formation. *J. Anat.*, 80: 194-204 (1946).
13. Houillon, C.: Embriología. 3a. ed. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1972.
14. Houillon, C.: Sexualidad. 2a. ed. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 1974.
15. Huettner, A.F.: Comparative Embryology of the vertebrates. 2nd. ed. MacMillan Company, New York, 1958.
16. Linares, T. and King, W.A.: Morphological study of the bovine blastocyst with phase contrast microscopy. *Therio.*, 14: 123-133 (1980).
17. Long, S.E. and Williams, C.V.: Frequency of chromosomal abnormalities in early embryos of the domestic sheep (ovis aries). *J. Reprod. Fertil.*, 58: 197-201 (1980).
18. Massip, A. and Mulnard, J.: Time - lapse cinematographic analysis of hatching of normal frozen-thawed cow blastocyst. *J. Reprod. Fert.* 58: 475-478 (1980).
19. Mohr, L.R and Trounson, A.O.: The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, 58: 189-196 (1980).
20. Nadijcka, M. and Hillman, N.: Ultrastructural studies of the mouse blastocyst substages. *J. Embryol. exp. morph.* 32: 675-695 (1974).

21. Oppenheimer, S.B.: Introduction to embryonic development. - 1th. ed. Allin and Bacon, Inc. Boston, 1944.
22. Patten, B.M.: Embriología humana. 1a. ed. El Ateneo, Buenos Aires 1973.
23. Renard, J.P., Menezo, Y. and Hegman, Y.: In vitro uptake of glucose by bovine blastocyst. J. Reprod. Fertil., 58: - 161-164 (1980).
24. Renard, J.P., Menezo, Y. and Hehman, Y.: Alternative test to assess the viability of bovine embryos. Therio., 17:106 (1980).
25. Rottman, O.J., and Lampster, W.W.: Development of early mouse and rabbit embryos without zona pelucida. J. Reprod. Fert., 65: 303-306 (1981).
26. Shea, B.F.: Evaluating the bovine embryos. Therio., 15: 31-46 (1981).
27. Schwartz, L.W.: Embriologia animal comparada. 1a. ed. Editorial Omega, S.A. Barcelona, 1977.
28. Wright, J.M.: Non-surgical embryo transfer in cattle embryo recipient interactions. Therio., 15: 43-56 (1981).
29. Wright, R.W., Jr., and Anderson, G.B.: Blastocyst expansion and hatching of bovine ova cultured in vitro, J. anim. sci., 43: 1970-1974 (1976).
30. Wright, R.W., Jr., Cupps, P.T., Gaskins, C.T. and Hillers, J. K.: Comparative solubility properties of the zona pellucidae of unfertilized murine and bovine ova. J. anim. sci., 44: 850-853 (1977).