

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"**



**CONSERVACION DE EMBRIONES DE  
RATAS A BAJAS TEMPERATURAS (4°C.)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**"MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA"**

P R E S E N T A

**RENE VASQUEZ RAMOS**

**DIRECTORES :**

**M.V.Z. RAFAEL ORDOÑEZ MEDINA**

**BIOL. RAUL ASTIAZARAN YBARRA**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

I N D I C E  
\*\*\*\*\*

C O N T E N I D O

PAGINA

I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	3
A.- DESARROLLO EMBRIONARIO	4
B.- CULTIVO DE EMBRIONES DE ANIMALES DE LABORATORIO.	7
C.- ALMACENAMIENTO DE EMBRIONES	8
1.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LOS PROCESOS METABOLICOS.	9
A) RESISTENCIA AL FRIO	11
B) ACTIVIDAD ENZIMATICA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA.	12
C) TEMPERATURA Y ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE LA CELULA.	14
2.- REFRIGERACION DE EMBRIONES.	14
III.- OBJETIVOS.	19
IV.- HIPOTESIS.	19
V.- MATERIAL Y METODOS.	19
A.- OBTENCION DE EMBRIONES.	19

# C O N T E N I D O

# PAGINA

B.- MEDIO Y METODO DE REFRIGERACION	21
VI.- RESULTADO Y DISCUSION.	22
VII.- CONCLUSIONES.	35
VIII.- BIBLIOGRAFIA	37

## I.- RESUMEN

Considerando los embriones de la rata (wistar) como modelos - apropiados de estudios en el área de reproducción, se planteó el objetivo de observar si la temperatura de refrigeración -- (4°C) alteraba la viabilidad de éstos.

Los estadios embrionarios estudiados fueron el de morula y -- blastocisto, los cuales se obtuvieron perfundiendo el oviduc-- to del animal en el cuarto y quinto día de la gestación res-- pectivamente. El medio de conservación utilizado para la re-- frigeración de los embriones, fué la solución de Fosfato - -- (PBS) suplementado con: Glucosa, Piruvato de Sodio, Antibióti-- cos y Suero de Rata.

Los tiempos de refrigeración fueron: 12 hrs., 24 hrs., 48 hrs., 72 hrs., y 120 hrs., al término de los cuales los em-- briones se colocaron en el medio de PBS nuevo y se cultivaron a 37°C por 24 horas con la finalidad de observar si continua-- ban su desarrollo.

LOS PORCENTAJES DE DESARROLLO EMBRIONARIO OBTENIDOS FUERON:

ESTADIO EMBRIONARIO	% DE DESARROLLO				
	TIEMPO ( HRS. )				
	12	24	48	72	120
MORULA	72.6	0	0	0	0
BLASTOCISTO	0	90.6	78.8	57.6	36.6

De los resultados obtenidos se puede reducir que la temperatura de refrigeración, por períodos de entre 24 y 48 horas, - - afecta poco la viabilidad de los Blastocistos de Rata, en contraposición al estadio de morula, el cual se ve sumamente - - afectado durante este período.



## II.- INTRODUCCION

Aunque los ovarios de los mamíferos contienen cientos de miles de ovocitos, el número de la progenie que una hembra produce es pequeño en relación a dicho número. En los animales domésticos, el número de veces que una hembra puede quedar -- preñada se ve limitada por el período que dura la gestación. Mas aún, solamente uno o dos óvulos se liberan por el 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 (17).

El primer trasplante exitoso de embriones lo reportó Heape en conejos, en 1980.

Hace varias décadas, se reportaron los primeros trasplantes -- exitosos de embriones en animales domésticos, como por ejemplo: borregos, cabras, cerdos y bovinos (35).

El trasplante de embriones es una técnica experimental con muchas aplicaciones en el área de la producción animal.

• Desde principios de siglo, se han desarrollado estudios enca-

minados a conocer las características morfológicas del ovocito de mamífero; sin embargo, no ha sido sino hasta las últimas décadas cuando se ha logrado un avance trascendental en este campo; debido fundamentalmente a la evolución de las ciencias biológicas en el área de la reproducción. Por otro lado, a partir de los 50's, la creación de medios de cultivo que han permitido el desarrollo de los embriones de mamífero invitro, lo que ha facilitado el avance del conocimiento Bioquímico del embrión.

#### A.- DESARROLLO EMBRIONARIO

Una vez realizada la fertilización en el oviducto se inicia el transporte del embrión a través de este, siendo característica de cada especie la duración que se requiere para que alcancen el útero (Cuadro Nº 1) (46), durante el descenso de los embriones se llevan a cabo las primeras etapas de la diferenciación embrionaria (17).

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 del tubo de falopio hay retención del embrión, mientras que en otras, la velocidad de traslado se ve incrementada considerablemente (8.15).

• 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 progestinas (32), así como tam - bién los flujos tubaricos y uterinos.

Durante el transporte a través del oviducto se inician las di - visiones mitóticas en el embrión, las cuales producen la for - mación progresiva de células de menor tamaño.

Los embriones de 2, 4 y 8 células así como la morula y el - - Blastocisto (estadio acompañado de una cavidad) (6), son en - tamaño prácticamente iguales al óvulo original, siendo sólo - en algunas ocasiones un poco más grande pero en todos los ca - sos teniendo menos masa. La formación de embriones de 4 y 8 células se lleva a cabo por medio de divisiones sincronizadas. En otras palabras, los blastómeros (24), se dividen practica - mente al mismo tiempo.

Las características (inicio, duración, etc.) de las divisi-- nes celulares en el embrión varían entre las diferentes espe - cies. Así por ejemplo, en la Rata la primera mitosis se pre - senta aproximadamente un día después de la fertilización, la segunda división se lleva a cabo en un período de tiempo más corto.

• Por otro lado en el ratón se forma la morula en la mañana del

tercer día después de la fertilización, mientras que en la mayoría de los mamíferos, alcanzan el estadio de morula aproximadamente en el quinto día y el de Blastocisto, al final de la primera semana de gestación (Cuadro Nº 1).

La mayoría de los investigadores coinciden en considerar el estadio de morula cuando hay 32 células o más sin que exista una cavidad en el interior del embrión. Sin embargo, esta observación es poco práctica, ya que en la mayoría de las especies es difícil contar bajo el microscopio el número de células que conforman el embrión, teniendo como complicación adicional que en algunas especies se presentan Blastocistos muy pequeños (rata, ratón hamster), además que al principio de la formación de la cavidad del Blastocisto (6), puede presentarse incluso en el estadio de las 16 células. De esta manera se recomienda denominar "Estadio Preblastocístico" al embrión que posea más de 8 células y que no cuente con espacio alguno en su interior.

Durante el transporte en la mayoría de las especies el embrión se encuentra rodeado por la zona pelucida, la cual le da una apariencia esférica de distribución uniforme (14,31,36)

En un polo del Blastocisto hay un grupo de células que sobresalen hacia la cavidad (masa interna, masa embrionaria), de estas células se formará posteriormente el embrión (13).



## B.- CULTIVO DE EMBRIONES DE ANIMALES DE LABORATORIO

El principal objetivo de las técnicas modernas es aprovechar de un modo más flexible el potencial reproductivo de los animales domésticos, tanto en términos de aprovechamiento para manipular en el laboratorio los gametos y los embriones no in plantados.

Los primeros estudios con embriones de conejo, demostraron -- que era posible cultivarlos desde el estadio de una célula -- hasta el de Blastocisto, siempre que el medio de cultivo contuviera una gran proporción (más del 50%) de suero homólogo o heterólogo tratado al calor (10), pero no se logra observar -- el desarrollo más allá de la fase citada.

En experimentos más recientes, se han estudiado los requerimientos nutritivos necesarios para el cultivo apropiado de cada una de las etapas de la preimplantación (29), y se ha encontrado la necesidad de incluir cierto tipo de aminoácidos -- al medio (11,21).

Generalmente resulta muy difícil cultivar el ovocito de muchos animales de laboratorio, mientras que los embriones obtenidos en el estadio de 4-8 células suelen desarrollarse in vi tro hasta el estado de Blastocisto, especialmente si en el medio de cultivo se incluye las fracciones proteicas adecuadas (40).

Sin embargo, los embriones de ratón de dos células si se pueden cultivar bien totalmente in vitro (7,41) en el interior - de las trompas de falopio (42), dando lugar a crías viables - después de ser transferidos a hembras receptoras (28).

De hecho el cultivo de embriones de ratón se ha empleado como modelo para estudiar las actividades y necesidades metabólicas de los embriones antes de su implantación y sobre la base de estos trabajos se identificaron las necesidades de Piruvato, lactato y algunas fuentes de nitrógeno en los medios cultivo.

### C.- ALMACENAMIENTO DE EMBRIONES

Para manejos experimentales y almacenamiento entre la recuperación y el trasplante, los embriones por lo general se mantienen en un medio de cultivo a 37°C. En la mayoría de los - estudios, el desarrollo de los embriones in vitro, se vuelve más lenta, con frecuencia a dos tercios de la tasa normal in vivo. Sin embargo, estos continúan desarrollándose por dos, tres o mas días, aunque la frecuencia de gestación por lo general se reduce si se trasplantan después de más de 24 hrs. - in vitro (12).

Estudios recientes llevados a cabo en borregos, (37, 47, 48 y 49) y cerdos (12, 25, 26 y 47) muestran que el desarrollo de los embriones de 4 o más células de estas especies se lleva a

cabo muy bien in vitro en medios relativamente simples.

Un embrión rara vez se mantiene con éxito durante varias horas hasta un día entre su recolección y su trasplante a temperatura ambiente (15-25°C); sin embargo, si se enfrían entre 0-10 grados centígrados o se transfieren al oviducto ligado de una coneja pueden almacenarse durante varios días con poca reducción de la viabilidad (5, 16, 23). El desarrollo de los embriones continúa de manera normal en el oviducto de la coneja, pero disminuye durante el almacenamiento a 0-10°C.

para su almacenamiento a largo plazo y transportación fácil, los embriones en la etapa final de morula o inicial de Blastocisto puede congelarse a la temperatura de nitrógeno líquido.

La principal desventaja de los embriones congelados es que -- las frecuencias de gestación son sólo de la mitad de aquellas obtenidas cuando se trasplantan embriones frescos (27,39). Sin embargo, actualmente la tecnología para el congelamiento de embriones esta mejorando rapidamente.

#### 1.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LOS PROCESOS METABOLICOS

Todas las células vivas estan expuestas a ciertos grados de variación térmica del medio. Dicha variación es muy limitada en algunos casos, sin embargo, cuando la temperatura del líquido interno que baña las células (sangre o líquido intersti

cial), se regula con mucho cuidado, por ejemplo, en los animales de sangre caliente se presentan pequeños cambios de temperatura.

En vista de sus efectos sobre los procesos vitales, y de que la mayor parte de las células solo tienen límites estrechos -- de adaptación a los cambios térmicos, la temperatura es un factor importante en la distribución de los seres vivos.

Una temperatura ambiental, no necesariamente puede ser óptima para todas las funciones celulares. Además, una temperatura favorable para una función dada durante una exposición breve de la célula puede resultar peligrosa si la exposición es prolongada. Por consiguiente, los efectos de la temperatura deben estudiarse con sumo cuidado, cuando se investiga un proceso biológico.

Los estrechos límites de temperatura dentro de los cuales las células llevan a cabo sus actividades vitales forman la zona Biocinética que va aproximadamente de 10-45°C.

Algunos microorganismos (termófilos) toleran temperaturas superiores a 45°C en tanto que otros (criófilos) pueden soportar temperaturas mucho más bajas que 10°C.

Casi todos los organismos pueden resistir variaciones de temperatura mucho mayores en estado inactivo que en estado activo (2).

#### A.- RESISTENCIA AL FRIO

Cuando la temperatura desciende hasta los límites inferiores tolerables, muchas células se vuelven relativamente inactivas. Muy pocas conservan su actividad en el punto de congelación del agua aún cuando pueden sobrevivir.

La Hipotermia, tanto natural (animales hibernantes) como la inducida (otros organismos) se acompaña de descenso de metabolismo (18).

Al exponer progresivamente a un organismo a temperaturas muy bajas, el agua se congela fuera de la célula con lo cual se concentra la solución que la rodea; por consiguiente, sale agua de las células hacia el líquido circundante, y el resultado es una mayor concentración de solutos en la célula (3).

Esta elevada concentración de solutos en la célula aumenta el punto de congelación, pero también es nociva para la célula, bien sea que se deba a congelación o aplicaciones directas a las células de soluciones de concentración equivalente (33,34)

En algunos casos, la célula puede perder hasta 60-90% de agua libre. Sin embargo, muchas células pueden soportar una casi - congelación a menos 5°C. Y volver a tomar agua durante la descongelación sin lesión demostrable (33,34).

### B.- ACTIVIDAD ENZIMATICA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

Una enzima es un biocatalizador de naturaleza protéica, al -- igual que otros catalizadores, acelera la velocidad de una -- reacción sin consumirse salvo en forma incidental en algunas reacciones colaterales. Podemos aceptar que en la célula la mayor parte de las reacciones son catalizadas por enzimas.

La función principal de un catalizador consiste en hacer descender la energía de activación (energía cinética) que necesita una molécula para poder intervenir en una reacción particular. En otras palabras el catalizador baja la barrera energética que la molécula ha de franquear. Aumenta así la velocidad de la reacción, porque a cualquier temperatura dada, es probable que las moléculas que tengan poca energía sean más - que las que tengan mucha.

La temperatura también modifica la actividad de las enzimas. Los experimentos con enzimas de hidrólisis indican que estas reacciones son más rápidas a la temperatura óptima para la hidrolasa.

La temperatura óptima difiere en las enzimas de distintos organismos (2).

En forma similar, la temperatura óptima para las actividades catalíticas de las enzimas hidrolíticas se encuentran muy cerca de la temperatura normal de la célula correspondiente (2).

Un aumento de la temperatura hasta la óptima significa hidrólisis más rápida porque es mayor el número de moléculas que posee la energía de activación necesaria (18).

Si se pasa del punto óptimo, disminuye otra vez la velocidad de hidrólisis. Esto se explica de la forma siguiente: Sólo -- tiene actividad catalítica la forma natural o no alterada de la enzima; por lo tanto, siendo iguales los demás factores, -- la velocidad de hidrólisis depende de la concentración de enzima natural. (18,33).

A cualquier temperatura, dentro de los límites característicos del organismo, existe un equilibrio entre enzima natural y desnaturalizada. Este equilibrio puede alterarse en cualquier dirección. Al aumentar la temperatura, aumenta también la proporción de la enzima desnaturalizada, por lo tanto, al disminuir la cantidad de enzima natural, la velocidad de la -- hidrólisis catalizada hace los mismo.

### C.- TEMPERATURA Y ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE LA CELULA.

La actividad respiratoria de una suspensión de células aumenta cuando la temperatura ambiente, dentro de los límites de la zona Biocinética también aumenta.

El coeficiente de temperatura (Q10) de la respiración, generalmente se encuentra entre dos y cuatro; esto significa que un aumento de temperatura de 10°C., eleva entre 2 y 4 veces la velocidad de las reacciones; sin embargo, la exposición a temperaturas superiores al óptimo en la zona biocinética puede producir una lesión después de la cual vuelve a descender la respiración (33).

### 2.- REFRIGERACION DE EMBRIONES.

La posibilidad de detener, el desarrollo de embriones in vitro puede contribuir a elevar el éxito en los programas de transferencia de embriones en los animales domésticos, ya que esto incrementaría el tiempo de la estancia de los embriones entre su obtención y su transferencia, lo que permitiría que estos puedan ser trasladados hasta donde se encuentran las hembras receptoras (4,19).

Dentro de los métodos empleados para disminuir el metabolismo embrionario se encuentran: El congelamiento (para períodos prolongados de tiempo) y la refrigeración para períodos bre-

ves de tiempo.

Sin embargo, el primer método cuenta con el inconveniente de requerir de equipos complicados y caros (4,19).

La refrigeración de embriones tanto de animales de laboratorio (ratón, conejo) como doméstico (vaca, cerdo) han sido estudiados por diversos autores; sin embargo, este procedimiento ha sido poco trabajado en los embriones de rata (43).

Wales ha encontrado que la Glicolisis de blastocistos cultivados in vitro a 37°C., no se vió afectada cuando esos mismos - embriones se encontraban en etapa de dos células y fueron refrigerados (5°C) por períodos breves (43).

El porcentaje de sobrevivencia tanto en los embriones refrigerados como de los congelados puede ser comparable de manera - favorable cuando han sido transferidos después de su tratamiento a hembras receptoras (4).

Los estudios realizados por Whittigham y Cols. (1969) han observado que la adición de Glicerol o Dimetilsufoxico (DMSO) - (5%v/v) al medio de refrigeración para embriones (sol. Ringer) de rata de dos células no aumentaba la viabilidad de estos - cuando eran refrigerados por un lapso de 24 hrs. a 4-5°C.

Así mismo, estos autores (Whittingham y Cols. 1969), han encontrado que la utilización de una solución de fosfato es más conveniente para emplearla en medio de refrigeración para embriones que una solución amortiguada con bicarbonato.

Linder y Cols. (1982), comentan que los porcentajes de viabilidad de los embriones, después de su refrigeración disminuye de cuando son cultivados in vitro a cuando son transferidos a hembras receptoras; y esto lo explica de la siguiente manera: Empleando tinciones fluorescentes especiales que tienen a las células muertas, han encontrado que el deterioro del 25% de los blastómeros de la masa celular interna de un blastocisto no impide su desarrollo in vitro; sin embargo, sí afecta su crecimiento in vivo.

El porcentaje del suplemento serico del medio de refrigeración, no influye de manera significativa en el desarrollo in vitro de los embriones cuando es incrementado de un 10 a un 25% (26).

Un enfoque importante de investigación que se ha dado a la transferencia de embriones de bovinos ha sido el desarrollo de sistemas de almacenaje de embriones, para todas aquellas ocasiones en donde estos sobrepasan el número de animales receptores que se tienen disponibles. Con este fin se han desarrollado especialmente dos técnicas como lo son el cultivo de embriones a temperaturas fisiológicas (47,49) y la congela-

ción en nitrógeno líquido (27).

El cultivo de embriones a temperaturas fisiológicas (30) ha probado ser una técnica eficiente que mantiene la viabilidad de estos fuera del ambiente materno por períodos cercanos a las 24 hrs., sin embargo, posee la desventaja de no inhibir el desarrollo metabólico embrionario (47,48); por lo que este método no puede ser utilizado de manera continua para almacenar embriones hasta el momento en que se cuente con una receptora disponible.

No así el congelamiento de embriones en nitrógeno líquido que detiene el desarrollo embrionario, por lo que pueden almacenar de manera indefinida los embriones.

Sin embargo, cuenta con diversas desventajas como lo son principalmente la complejidad de su técnica y el elevado costo -- del equipo (3,44).

Diversos autores han comenzado a estudiar una tercera posibilidad para el almacenamiento de embriones; la cual consiste básicamente en refrigerar los embriones a temperaturas que -- van de 0 a 10°C., por períodos de uno a quince días (1,9,20,-22,38,45).

CUADRO 1

(46)

RELACION ENTRE EL TRANSPORTE Y ESTADIO DE DIFERENCIACION  
DEL EMBRION

ESPECIES	DURACION DEL TRANSPORTE A TRAVES DEL OVIDUCTO (HRS)	2cel	4cel	16cel	BLAS-TOCIS TO.	ESTADIO QUE EN-TRA EN CAVIDAD UTERINA	DIA DE IMPLAN TACION
HUMANO	60-70					morula temprana	6-7
MON-RHESUS	96	48	60	84	120	morula tardía	9
CERDO	24-48					1cel.	11-20
CONEJO	56-62	48	60	72	84	morula tardía	7
OVEJA	77-96					morula tardía	15-17
VACA	96					morula temprana	
CABRA	98					morula temprana	
PERRO	192-168					morula tardía	11-12
GATO	144-168	72	84	96	120-146	morula tardía	11-12
RATA	95-100	48-72	84	108	120	morula tardía	6
RATON	72	48	72	84	96	morula tardía	5
GERBO		48	72	84	96		6
HURON		72	84	96-120	144-168	morula temprana	11-12
CONEJILLO DE INDIAS		72	96	120	136	8cel.	6
HAMSTER		48	72	96	118	4-8 cel.	5
ZORRO		72	96	120-144	144-168		

### III.- OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el de estudiar si la temperatura de refrigeración (4°C) altera el desarrollo in vitro de los embriones de rata, así como observar que estadio embrionario (morula o blastocisto) resulta más adecuado para dicho tratamiento.

### IV.- HIPOTESIS

Si la temperatura de refrigeración (4°C) disminuye los procesos metabólicos celulares, entonces un embrión de rata en el estadio de preimplantación se podría almacenar a dicha temperatura sin que su viabilidad se vea modificada.

### V.- MATERIAL Y METODOS

#### A.- OBTENCION DE EMBRIONES.

El material que se utilizó en el presente trabajo fué: Estuche de disección, microscopio invertido (Olympus), microscopio de contraste de fases (Olympus), caja de petri, vidrio de reloj, tubos de ensayo y pipetas pasteur.

Los embriones utilizados son de rata Wistar y los estadios embrionarios estudiados fueron el de morula y el de blastocisto, los cuales se obtuvieron en el cuarto y quinto día del embarazo respectivamente (considerándose como día I, el día de la - detección del tapón vaginal.

Para la obtención de los embriones se procedió de la siguiente manera: Se sacrifica el animal por medio de la dislocación cervical, su región ventral se esteriliza utilizando una solución de benzal diluida al 0.1%, para posteriormente efectuar en esta región una incisión en forma de "V" con la finalidad de poner al descubierto el aparato reproductor.

Se disecan los oviductos así como el útero y se sumergen en una solución salina esteril. Para la obtención de los embriones se perfunden los oviductos en su región fimbriada utilizando una aguja del # 27 y pinzas de relojero.

Aproximadamente se requiere de 1-2 ml. de solución salina esteril para lograr perfundir completamente el órgano. El líquido de perfusión se colecta en vidrios de reloj para su posterior observación.

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

Las operaciones de colecta y traslado de los embriones se realizan con una pipeta Pasteur cuya punta posee un diámetro de 150 micras aproximadamente.

#### B.- MEDIO Y METODO DE REFRIGERACION.

El medio utilizado tanto para la colecta, refrigeración y cultivo de los embriones fue la solución de fosfato de Dulbecco (PBS) suplementada con Glucosa (1g/lit). Piruvato de sodio - - (0.028g/lit) Penicilina (100-UI/ml) y suero de rata (20%).

Una vez clasificado los embriones se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 1 ml. de medio de refrigeración. Los tubos se cerraron herméticamente y se depositaron en un vaso -- precipitado que poseía 200 ml. de agua a temperatura ambiente, con la finalidad de que este sistema regulara la disminución de la temperatura cuando se coloque en el interior del refrigerador.

El tiempo aproximado que se lleva en alcanzar la temperatura de 4°C es de 4-5.5 hrs. Durante todo el tiempo que los embriones permanecieron almacenados se encontraron en completa obscuridad, la cual se logró cubriendo cuidadosamente el recipiente que las contenía con papel aluminio.

Los tiempos de refrigeración estudiados fueron de: 12 hrs., -

24 hrs., 48 hrs., 72 hrs., y 120 hrs. Al término de estos períodos se colocaron los tubos de ensaye que contenían a los embriones, a temperatura ambiente para dejar que estos alcanzaran dicha temperatura, lo cual llevaba media hora aproximadamente.

Posteriormente, los embriones se evaluaron nuevamente y se colocaron en medio fresco para su cultivo a 37°C en una estufa de temperatura controlada por un período de 24 hrs., con la finalidad de observar su viabilidad en forma de desarrollo.

## VI.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos sobre refrigeración embrionaria se encuentran en la tabla uno, como en las siguientes láminas fotográficas. De esto se puede hacer notar lo siguiente:

- A.- Los embriones en el estadio de morula son más sensibles a la temperatura de refrigeración que los blastocistos, ya que solo pueden ser almacenados bajo estas condiciones por 12 hrs.
- B.- El desarrollo in vitro de los blastocistos posterior al tratamiento de refrigeración, se ve poco afectada cuando la duración de este no excede las 24 hrs., ya que se ob-

tuvo un 90.6% de desarrollo embrionario dentro de este período.

- C.- La viabilidad de los embriones almacenados a 4°C disminuye con el tiempo; sin embargo, la velocidad de la disminución de la temperatura no la afecta. El porcentaje de desarrollo de blastocistos cultivados in vitro fue de - 90.6%, 78.8%, 57.6% y 36.6% después de que fueron almacenados a 4°C por 24 hrs., 48 hrs., 72 hrs., 120 hrs. respectivamente.
- D.- Los blastocistos refrigerados por un período de 48 hrs., o más sufren en un gran porcentaje una colapsación - - - (70-80%) (ver láminas fotográficas).
- E.- Cuando los blastocistos colapsados son colocados a temperaturas fisiológicas de cultivo (37°C) recuperan su espacio blastocelico (ver láminas fotográficas), lo cual sugiere que los blastómeros embrionarios reestablecieron su metabolismo celular.
- F.- Los blastocistos desarrollados después del período de -- cultivo a 37°C, adquieren un aspecto granuloso visible - posiblemente debido al tratamiento de refrigeración. Una posible explicación de que los embriones en el estadio - de morula resultaron menos tolerantes al almacenamiento

a 4°C, puede ser el hecho de que las células que lo conforman son de tamaño superior a las de los blastocistos, por lo que esta superficie celular mayor puede ser más sensible al daño por temperatura.

Bon Durán (1981) reporta lo siguiente sobre la colapsación de los Blastocistos durante los tratamientos de refrigeración -- (4).

La colapsación de los blastocistos durante el tratamiento de refrigeración parece ser fenómeno frecuente después de los -- primeros dos días de almacenaje y podría ser debido probablemente a la detección del mecanismo del transporte activo, el cual ha sido reportado como responsable del mantenimiento de la cavidad blastocélica.

Una prueba de lo anterior es el hecho de que los embriones colapsados restablecen su cavidad blastocelica después de que -- son colocados a 37°C.

No existen diferencias significativas, comenta Linder (1983) entre los blastocistos colapsados y los que han logrado mantener su cavidad blastocelica durante el período de refrigeración, cuando después de ese tratamiento son cultivados in vitro o transferidos a hembras receptoras (26).

Para poder determinar la viabilidad definitiva de estos embriones de rata refrigerados, es necesario que sean transferidos a hembras pseudoembarazadas, ya que, ni el cultivo in vitro - ni las tinciones fluorescentes las podrían determinar con exactitud.

Linder 1983 comentó que al haber teñido los embriones almacenados en refrigeración, con técnicas fluorescentes se coloreaba el núcleo de las células muertas, observó una mayor proporción de blastómeros dañados en la masa celular interna que en las trofoblásticas de los blastocistos almacenados por tres días (26).

Debido a que en el estadio de blastocisto la célula de la masa celular interna representan una proporción menor que las trofoblásticas, blastocisto que posea una actividad metabólica activa de estas últimas pero con la masa celular destruída podría desarrollarse in vitro, sin embargo, no podría continuar su crecimiento en el interior de una hembra receptora -- (26, 43).

TABLA 1

DESARROLLO IN VITRO DE EMBRIONES DE RATA EN EL ESTADIO DE MORULA Y BLASTOCISTO DESPUES QUE FUERON MANTENIDOS A 4°C POR DIFERENTES LAPROS DE TIEMPO.

ESTADIO EMBRIONARIO	% DESARROLLO				
	TIEMPO (HRS)				
	12	24	48	72	120
	(62/45)*(61/0)*				
MORULA	72.6	0	0	0	0
	(64/58)*(66/52)*(66/38)*(60/22)*				
BLASTOCISTO	0	90.6	78.8	57.6	36.6

\* EMBRIONES ALMACENADOS / EMBRIONES DESARROLLADOS.

LAMINA Nº 1

REFRIGERACION DE MORULA DE RATA

LAMINA I: REFRIGERACION DE MORULA DE RATA



FIG. 1. MÓRULAS DE RATAS COLECTADAS EN EL CUARTO DÍA DEL EMBARAZO.

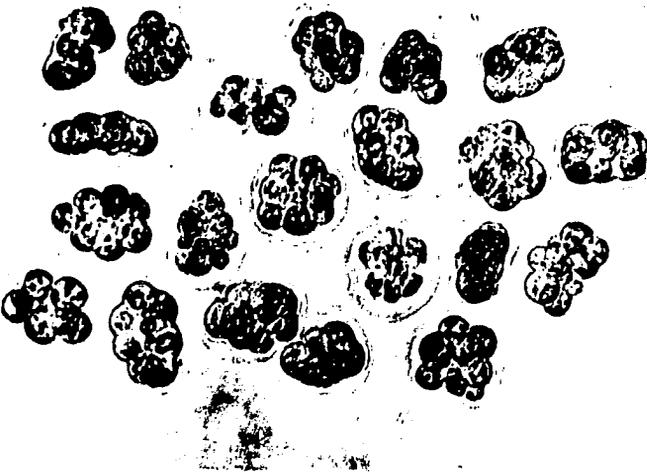


FIG. 2. MÓRULAS REFRIGERADAS POR 12 HORAS.

LAMINA Nº 2.

REFRIGERACION DE MORULAS DE RATA

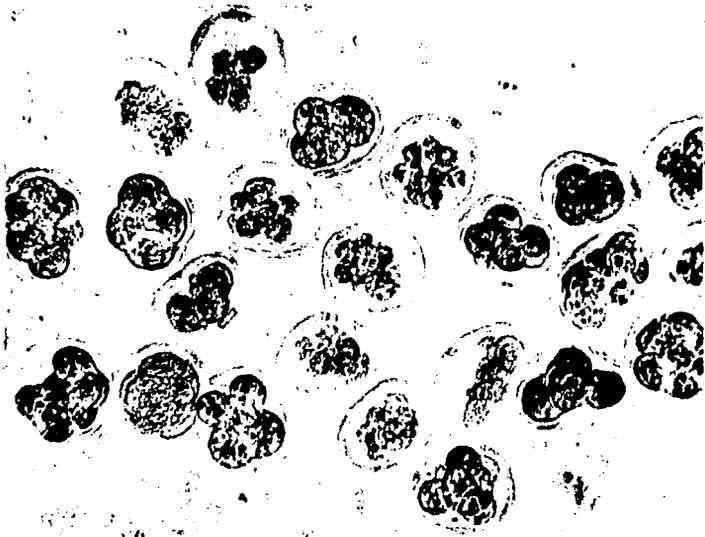


FIG. 3. MÓRULAS REFRIGERADAS POR 48 HORAS.



FIG. 4. BLASTOCISTOS DESARROLLADOS A PARTIR DE MÓRULAS REFRIGERADAS 48 HORAS Y CULTIVADAS POSTERIORMENTE IN VITRO.

LAMINA Nº I

REFRIGERACION DE BLASTOCISTOS DE RATA

LAMINA 1: REFRIGERACION DE BLASTOCISTOS DE RATA



FIG. 1. BLASTOCISTOS COLECTADOS EN EL QUINTO DIA DEL EMBRAZO.



FIG. 2. BLASTOCISTOS COLAPSADOS DESPUES DE 48 HORAS DE REFRIGERACION

LAMINA Nº II

REFRIGERACION DE BLASTOCISTOS DE RATA

100  $\mu$ M

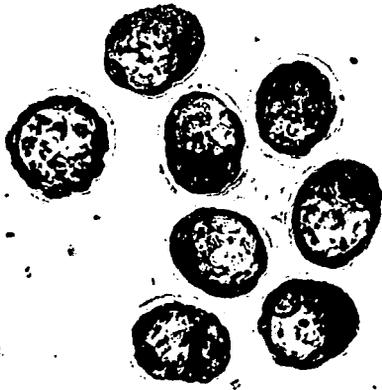


FIG. 3. BLASTOCISTOS REEXPANDIDOS DESPUES DE 6 HORAS DE CULTIVO IN VITRO.



FIG. 4. BLASTOCISTOS REEXPANDIDOS DESPUES DE 24 HORAS DE CULTIVO IN VITRO.

## VII.- CONCLUSIONES

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

- I.- Que los embriones en el estadio de morula son más sensibles que los blastocistos a los daños producidos por el almacenaje a 4°C.
- II.- Que la viabilidad in vitro de los blastocistos refrigerados por un lapso de 48 hrs. no se ve considerablemente afectada.
- III.- Que los embriones en estadio de blastocistos sufren una colapsación (pérdida del espacio blastocelico) a consecuencia de la temperatura de refrigeración, sin embargo, estos pueden restablecer dicho espacio cuando son colocados a temperatura fisiológica.

RECOMENDACION DEL AUTOR:

Con los conocimientos que se adquieren en futuras investigaciones sobre los requerimientos de los embriones de mamíferos en el laboratorio, será posible desarrollar medios de refrigeración más eficientes que permitan el almacenamiento de los embriones por períodos prolongados, sin que su viabilidad se vea afectada, lo cual beneficiará los niveles reproductivos de los animales domésticos.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, G.B. and Foot, R H., 1975. Development of rabbit embryos after storage at 10° C.J. - - Anim. Sci. 40: 900-904.
- 2.- Belenhradek, J., 1975. A unified theory of cellular rate process based upon an analysis of temperature action. Proto plasma 48: 53-71.
- 3.- Bilton, R.J. and Moore, N.W., 1979. Factors affecting the viability of frozen stored cattle embryos. Aust. J. Biol. Sci. 52: 391-398.
- 4.- Bon Durant, R.H., Anderson, G.B., Boland, M.P., Cupps, -- P.T. and Hughes, M.A., 1982. Preliminary studies on bovine embryos survival following short-term storage at 4°C. Theriogenology 17: 223-230.
- 5.- Boland, M.P., Crosby, T.H. and Gordon, I., 1978. Morphological normality of cattle embryos following superovulations using PMSG. Theriogenology 10: 175.
- 6.- Borland, R.M., Biggers, J.J. Lechene, C.P. 1977. Studies on the Composition and formation of mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis. Develop. Biol 55:1.

- 7.- Brinster, R.L., 1963. A Method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Expl. Cell. Res* 32:205-208.
- 8.- Croxato, H.B. and Ortiz, M.E.S., 1975. Eggs Transport in the Fallopian tube. *Gynecol. Invest.* 6:215
- 9.- Chang, M.C., 1947. Normal development of fertilized rabbit ova Stored at Low Temperature for several days *Nature, London.* 159:602-603.
- 10.- Chang, M.C., 1949. Effects of heterologous sera on fertilized Rabbit ova. *J. Gen. Physiol.* 32: 291-300.
- 11.- Daniel, J.C. and Olson, J.D., 1968. Amino acid requirements for cleavage of the rabbit ovum. *J. Reprod. Fert.* 15; 453-455.
- 12.- Davis, D.L. and Day, B.N., 1978. Cleavage and blastocyst formation by Pig eggs in vitro. *J. Anim. Sci.* 46:1013.
- 13.- Ducibella, T., Prena, T., Karnosky M. and Anderson, E., - 1978. Changes in cell Surface and Cortical Cytoplasmic organization during early embryogenesis in the Preimplantation mouse embryo. *J. Cell. Biol.* 74: 153

- 14.- Flechon, J.E. and Renard, L.P., 1978. A Scanning electron Microscope study of in the hatching. J. Reprod. fert. 53:9.
- 15.- Gomez, C.V. and Croxatto, H.B., 1977. A study of the time Course of egg retention activity in the rabbit oviduct. J. Reprod. fert. 50:69.
- 16.- Hafez, E.S.E., 1971. Egg storage in methods in mamalian embryology. J.C. Daniel Jr. (ed). Sn. Francisco, W.H. Freeman, p.p. 117-132.
- 17.- Hicks, J.J., Gil, Recans, M.E., 1980. Características -- funcionales del cigoto de mamíferos durante la preimplantación. Ginec. Obst. Méx. - 47: 275-291.
- 18.- Hock, R.J. and Covine, B.C., 1970. Hypotermia. Sci. Am. 198:104-114.
- 19.- Hughes, M.A. and Anderson, G.B., 1982. Short term Storage of Rabbit embryos at 4°C. Theriogenology 18:275-282.
- 20.- Hunter, R.H.F., 1982. Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza España.

- 21.- Kame, M.T. and Foote, R.H., 1970 Fraccionated Serum dialy-  
sate and synthetic media for culturing 2 -  
and 4 cell rabbit embryos.  
Biol. Reprod. 2: 356-362.
- 22.- Kardymowicz, O., 1962. Storage of Fertilized Rabbit ova.  
Nature. 193: 486-487.
- 23.- Lawson, R.A.S., Rowson, L.E.A. and Adams, C.E. 1972. The  
Development of cow eggs in the rabbit re--  
transfer to heifers, J. Reprod. Fert. 28:  
313.
- 24.- Lin. T.P., 1976, Interection of mouse and rat blastomer -  
and development of composite blastocysts.  
J. cell. Biol. 70:68a.
- 25.- Linder, G.M., Anderson, G.B., Bon Durant, R.H., Cupps, P.  
T. and Gorman, G.G. 1982. Development of  
bovine embryos after storage at 4°C. The-  
riogenology 17:96.
- 26.- Linder, G.M., Anderson, G.B., Bon Durant, R.H. and Cupps,  
P.T. 1983. Survival of bovine embryos sto-  
red at 4°C. Theriogenology 20: 311-319.
- 27.- Maurer, R.R., 1978. Freezing mamalian embryos: a review -  
of techniques. Theriogenology 9: 45-98.

- 28.- Mc Laren, A. and Biggers, J.D. 1958. Successful development and birth of mice cultured in vitro - as early embryos. Nature, London. 182: 877-878.
- 29.- Onuma, H. Maurer, R.R. and Foote, R.H., 1968. In vitro culture of Rabbit ova from early cleavage stage to the blastocyst stage. J. Reprod. Fert. 16: 491-498.
- 30.- Peters, D.F. Anderson, G.B., Bon Durant, R.H. Cupps, P.T. and Drost, M. 1978. transfer of cultured - bovine embryos. Theriogenology 10: 337-342.
- 31.- Raswerler, J.J., 1977., Preimplantación development fate of the zona Pellucida and observations on the glycogenrich oviduct of little bulldog *noctilio albiventris*. Am. J. 33: 343.
- 32.- Robler, L.S., and Carabagnon, A.C., 1977. Effect of Oestradiol 17B and Progesterone on oviductal - - transport and early development of mouse - ova. J. Reprod. Fert. 57: 91.
- 33.- Schondeler, P.F., Hock, R., Walter V. and Irving L., 1950 Adaptation to cold in relation to body temperature, in julation, and basal metabolic rate. Biol. Bull. 99: 259-271.

- 34.- Schondeler, P.F., Flagg, W. Hock, R., and Irving L., 1953. Studies on Physiology of frozen plants and animals in artic. J. Cell. Comp. Physiol. 42 (suppl): 1-56.
- 35.- Seidel, G.E., Sugie, T. and Hafez, E.S.E., 1984 Transplante de Embriones en Reproducción e Inseminación Artificial en los animales. Ed. Hafez, E.S.E. Interamericana MEX.
- 36.- Surani, M.A.H., 1975. Zona Pellucida denudation blastocyst Proliferation and attachment in the rat. J. Embryol Exp. Morph. 33: 343.
- 37.- Tervit, H.R. and Goold, P.G., 1978. The culture of sheep embryos in either a bicarbonate buffered - medium enriched with Serum. Theriogenology 9: 251.
- 38.- Trounson, A.B., Willadsen, S.M. and Rowson, L.E.A. 1976. The influence of in vitro culture and cooling on the Survival and development of -- Cow embryos. J. Fert. 47: 367-370.
- 39.- Trounson, A.B., Shea B.F., Ollis G.W. and Jacobson, M.E., 1978. Frozen Storage and transfer of bovine embryos. J. Anim. Sci. 47: 677.
- 40.- Whitten, W.K., 1956. Culture of tubal Mouse ova. Nature, London. 177: 96.

- 41.- Whitten, W.K., 1957. Culture of tubal ova. *Nature*, London 179: 1081-1082.
- 42.- Whittingham, D.C. and Biggers, J.D., 1967. Fallopian tube and early cleavage in the mouse. *Nature*, London 213: 942-943.
- 43.- Whittingham, D.C., and Wales, R.G., 1969. Storage embryos in vitro. *Aust. J. Bio Sci.* 22: 1065-1068.
- 44.- Willadsen, S.M., Trounson, A.O., Polge, C., Rowson, - -- L.E.A. 1976. Preservation of cow eggs in: egg Transfer in cattle, Comission of European Committeas, Luxemburg, L.E.A., Rowson, ed. p. p. 117-124.
- 45.- Wilmut, I. Polges, C. and Rowson. L.E.A., 1975. The - -- affect on cow embryos of Colling to 20°C, 0°C and 196°C. *J. Reprod. Fert.* 45: 409- - 411.
- 46.- Wimsatt, W.A., 1975. Some Comparative aspect of implantation. *Biol. Reprod.* 12: 1.
- 47.- Wright, R.W., Anderson, G.B., Cupps, P.T. and Drost, M. - 1976. Blastocyst expansion and hatching of bovine ova culture in vitro. *J. Anim. Sci.* 43: 170.

- 48.- Wright, R.W., Anderson, G.V. Cupps, P.T. and Drost, M. -- 1976. Successful culture in vitro of bovine embryos to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 14: 157-162.
- 49.- Wright, R.W., Anderson, G.B., Cupps, P.T., Orost M. and - Bradford G.E., 1976. In vitro culture of - embryos from adult and prepuberal ewes. J. Anim. Sci. 42: 912.