

95
24



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**ALMACENAMIENTO DE EMBRIONES EN
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Roberto Oliva Cisneros



Cuautitlán, Izcalli.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGS.
I RESUMEN	I
II INTRODUCCION	3
A) Antecedentes e Importancia de la Trans- ferencia de Embriones.	3
B) Almacenaje de Embriones.	5
1.- Refrigeración.	6
2.- Congelación.	7
3.- Biológico.	8
C) Generalidades Reproductivas de la Rata.	10
1.- Ciclo Estrual.	10
2.- Gestación.	15
3.- Pseudogestación.	16
D) Implantación Retardada.	16
III OBJETIVOS	19
IV MATERIAL Y METODOS	20
A) Obtención de Embriones.	20
1.- Ratas Donadoras.	20
2.- Ratas Receptoras.	22
B) Técnica de Transferencia de Embriones.	25
C) Recuperación de Embriones.	26
V RESULTADOS	29

	PAGS.
VI DISCUSION	34
VII CONCLUSIONES	37
VIII BIBLIOGRAFIA	39

I RESUMEN

Dentro de las técnicas desarrolladas para el transporte de embriones de animales domésticos, se encuentra el almacenaje de estos en el interior del aparato reproductor del conejo. Sin embargo, actualmente este tipo de animales no resulta muy económico para poderlos emplear en esta clase de investigaciones.

De esta manera, el objetivo del presente trabajo fue el de estudiar si la rata blanca de laboratorio (raza Wistar) es capaz de preservar en buen estado por varios días los embriones que le hayan sido transferidos.

Los animales fueron ovariectomizados en el segundo día de pseudopreñez, con la finalidad de suprimir la producción de hormonas ováricas (estrógenos), recibiendo posteriormente un tratamiento hormonal con progesterona. En el quinto día se les transfirieron embriones que procedían de otros animales de la misma especie.

Estos embriones huéspedes permanecieron en el lumen uterino de la receptora por un lapso de 3, 5 y 10

días, para posteriormente ser recuperados y evaluados.

El aspecto morfológico de los embriones huéspedes recolectados al final del tratamiento hormonal (3, 5 y 10 días), es el mismo que el observado en los blastocistos elongados de manera natural en el sexto día de embarazo. Sin embargo, el porcentaje de recolección se vio sumamente disminuido conforme se prolongaba el tiempo de estancia de los embriones en el interior de las receptoras. Los porcentajes de recolección fueron: 68.0%, 31.0% y 9.4% para los embriones almacenados 3, 5 y 10 días respectivamente.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo y con los de investigaciones próximas, en donde se emplearan embriones interespecíficos, nos ayudaran para determinar si la rata puede emplearse como un vehículo de almacenaje y transporte de embriones de mamíferos.

II INTRODUCCION

A.- ANTECEDENTES E IMPORTANCIA DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

En términos generales la transferencia de embriones consiste en la extracción de un embrión en las primeras fases de su desarrollo (blastocisto), del aparato reproductor de la madre y este es transferido al aparato reproductor de otra hembra, donde el embrión completará su desarrollo hasta el nacimiento (8).

La historia de la transferencia de embriones se remonta al año de 1890, en el cual, Heape logró transferir un embrión del tracto reproductor de una coneja al de otra, obteniendo resultados satisfactorios (10). Cin cuenta años más tarde otros investigadores como Warwick y Col, experimentaron con embriones de ovejas, pero no como una investigación de laboratorio simplemente, sino dándole un enfoque más práctico a su trabajo (20).

Desde finales de la década de los cuarentas, hasta la fecha, esta técnica ha despertado gran interés dentro

de las personas dedicadas a la ciencia animal, como un instrumento de reproducción y utilizandola como un pro ducto comercial.

Actualmente, más del 90% de la actividad comercial de la transferencia de embriones, ha sido enfocada hacia el ganado bovino. Sin embargo esta técnica puede ser - aplicada a otras especies y muy adecuadamente a aquellas especies que estan en peligro de extinción (22).

Las ventajas que la transferencia de embriones ofrece a los ganaderos son muchas y entre ellas tenemos (20, 22):

- 1.- Aumenta la capacidad reproductiva de una ternera o vaca valiosa.
- 2.- Permite aprovechar el potencial genético de hembras que sufren lesiones o que por cualquier razón no pueden gestar o parir pero que son fértiles.

- 3.- Se acorta el intervalo entre generaciones, mediante la hiperovulación de hembras adultas.
- 4.- El trasplante de embriones de razas finas a receptoras nativas de baja productividad, permite utilizar el potencial genético de aquellas en un ambiente completamente diferente.
- 5.- Permite la incorporación de nuevas razas y líneas a regiones donde las leyes prohíben la importación de animales.

B.- ALMACENAJE DE EMBRIONES

El desarrollo de métodos de almacenamiento de embriones es un requerimiento primario antes de que la técnica de transferencia de embriones sea aplicada, ya que elimina la necesidad de transferir los embriones inmediatamente y de tener gran número de receptoras en sin cronía el mismo día de la recolección.(12).

En general existen tres métodos para el almacenamiento y transporte de embriones los cuales son: Refrigeración, Congelación y un tercero que es dentro del aparato reproductor de animales de laboratorio (Biológico).

1.- REFRIGERACION

Este método se puede considerar como una variante de la congelación, puesto que los embriones se conservan a temperaturas bajas (0-10°C). Solo se recomienda cuando los embriones requieran ser almacenados por un corto periodo de tiempo (algunas horas) o que se vayan a transportar a distancias cortas, ya que se ha demostrado que la viabilidad de los embriones disminuye mucho cuando éstos se almacenan a bajas temperaturas,(2,14).

Trowson y Col (21), almacenaron veinte blastocistos de vaca, previamente cultivados, durante 48 horas a 4°C y luego se transplantaron a diez receptoras, colocándoles uno en cada cuerno uterino y solo se desarrollaron ocho fetos normales en seis receptoras.

2.- CONGELACION

Este método posee actualmente más ventajas sobre la refrigeración como son (22):

- a.- Las células congeladas no pueden sufrir mutaciones genéticas ni están expuestas a la contaminación bacteriana.
- b.- Se pueden transportar, en forma barata y rápida embriones de animales valiosos a largas distancias y lugares poco accesibles, minimizando el riesgo de introducir enfermedades y eliminando la necesidad de hacer cuarentenas.
- c.- Con la congelación se pueden almacenar los embriones hasta que las pruebas de progenie estén disponibles.

Sin embargo, a pesar de estas ventajas y muchas más que puede ofrecer la congelación embrionaria, la gran desventaja que tiene es que aun con las mejores técnicas que se tengan disponibles se obtiene solamente un 50%,

máximo de gestaciones comparado a cuando no se congela, aunado al alto costo que tiene el equipo que se requiere para la congelación de embriones (14). Esto se puede comprobar con algunos reportes que se tienen en los que nos indican que un porcentaje muy bajo de embriones continuaron su desarrollo después que se congelaron (2, 4, 24).

3.- BIOLÓGICO

Un tercer método para almacenar embriones y ser transportados a largas distancias, el cual precedió a la refrigeración y congelación es el de transferir los embriones al tracto reproductor de animales de laboratorio como puede ser la coneja, donde estos dependiendo de la etapa en que se transfieran, continuarán su desarrollo (1, 11, 12, 13).

Un estudio realizado por Lawson y Col (12), nos muestra como al transferir un alto número de mórulas a los oviductos de coneja estas se desarrollaron hasta blastocistos. Se recobraron un total de 48 huevos de vaca fertilizados (mórulas) y se transfirieron a los

oviductos de coneja adulta que no tenían ningun tratamiento. Estas conejas se sacrificaron después de dos, tres y cuatro días para la recolección de los huevos, seccionando los oviductos. De los 48 huevos transferidos, 41 fueron recuperados y de estos, 34 aparecieron normales y siete se fragmentaron.

Experimentos similares al anterior se han realizado pero con embriones de otras especies, obteniendo el mismo éxito. Allen y Col (1), recolectaron cinco embriones normales y uno de ocho células de distintas yeguas, estos embriones fueron transferidos a los oviductos ligados de conejas en estro. Las conejas fueron transportadas de Cambridge hasta Cracovia, en una jornada de 33 horas, después de que los embriones permanecieron de cuarenta a cuarenta y cuatro horas en el oviducto de la coneja se recuperaron los seis embriones por lavado del oviducto, previo sacrificio de los animales, y se retransfirieron quirúrgicamente a cuatro yeguas receptoras. Se les realizó el diagnóstico de gestación, a las yeguas, entre los 35-80 días por medio de la detección inmunológica de PMSG (gonadotropina sérica de yegua preñada) y sólo una de las cuatro falló en concebir.

No solamente se han almacenado y transportado embriones de vaca y yegua en los oviductos de las conejas sino tambien embriones de ovejas con resultados muy similares a los anteriores como lo demuestran Hunter y Col y Lawson y Col (11, 13).

C.- GENERALIDADES REPRODUCTIVAS DE LA RATA

1.- CICLO ESTRUAL

Cuando las hembras llegan a alcanzar la madurez sexual, o pubertad, surge en ellas tipos rítmicos de conducta sexual, este cambio de conducta (receptibilidad sexual) se llama estro. La combinación de acontecimientos fisiológicos que comienzan con un periodo estrual y terminan con el siguiente; se le llama ciclo estrual (15).

Se considera que la rata es un animal poliestrico estacional, pues cicla continuamente y su ovulación es de tipo espontanea ya que el epitelio uterino responde a la estimulación hormonal (9).

El ciclo estrual en los animales domésticos, no excluyendo a la rata de laboratorio, se puede dividir en cuatro fases: Estro, Metaestro, Diestro y Proestro (15).

a.- FASES

Muchos animales presentan una periodicidad en su receptibilidad sexual y muestran cambios en sus patrones de comportamiento y sus características externas, que pueden ser usadas para definir particularmente la fase del ciclo en que se encuentren. En la rata estas características están relacionadas con la citología tomada del tracto reproductivo, específicamente de la vagina (8, 9).

1.- ESTRO: se define como el periodo de receptibilidad sexual, es cuando la hembra está preparada para la aceptación del macho. En esta fase ocurre la ovulación y se inicia la formación del cuerno amarillo. En la rata esta fase puede durar de 9-15 hrs. y se presentan algunos cambios en sus comportamientos como son: la movilidad dentro de la jaula aumenta, las orejas se erectan y

se presenta una curvatura en la columna vertebral (lordosis), cuando existe otra rata. En la citología tomada de la vagina se observan células cornificadas y durante la última parte del estro estas células aparecen degeneradas y en muchos casos se recuperan masas agregadas de material celular. En esta fase los niveles de estrógenos y LH comienzan a decrecer (9, 15).

2.- METAESTRO: es la fase post-ovulatoria, se caracteriza por el desarrollo del cuerpo amarillo. Esta fase puede durar de 18-24 horas. En la citología tomada de la vagina observamos la presencia de leucocitos alrededor de las células cornificadas. La producción de progesterona comienza (9, 15).

3.- DIESTRO: es la fase más larga de las cuatro y en la rata tiene una duración de 60-70 horas. En esta fase observamos que en la citología vaginal la mayor parte esta compuesta por leucocitos. En esta fase es cuando predomina la progesterona luteínica sobre las estructuras sexuales accesorias (9, 15).

4.- PROESTRO: es una fase preliminar para el próximo periodo estrual. Esta fase tiene una duración de 10-15 horas. La citología vaginal que podemos observar consiste en células epiteliales nucleadas. En esta fase los valores de progesterona disminuyen y la liberación de FSH estimula el crecimiento folicular y así aumentan las concentraciones de estrógenos que conducen al estro (9, 15).

CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS Y COMPORTAMIENTO DE LA RATA DURANTE EL CICLO ESTRUAL DE HAFEZ ESE (9).

FASE DEL CICLO	SECRECIÓN VAGINAL	DURACIÓN	COMPORTAMIENTO
ESTRO	CÉLULAS Cornificadas	12 Hrs.	Lordosis y aceptación del macho
METAESTRO	Leucocitos y Células Cornificadas	21 Hrs.	No acepta al macho
DIESTRO	Leucócitos	57 Hrs.	No acepta al macho
PROESTRO	Células Epiteliales Nucleadas	12 Hrs.	Acepta al macho al iniciar esta etapa

Los cambios cíclicos en la citología vaginal estan bajo el control de los estrógenos ováricos y la producción de estos está controlada por la secreción de gonadotropinas pituitarias, las cuales son FSH y LH. La liberación de estas gonadotropinas esta controlada por la concentración de estrógenos y progesterona circulantes en la sangre. Una baja concentración de estrógenos estimulan a la pituitaria para que se libere FSH. Cuando los folículos ováricos estan completamente desarrollados y la concentración de estrógenos aumenta en la sangre, hay un mensaje que se manda a la pituitaria para que se promueva la formación de LH. La ovulación ocurre mientras las cantidades de LH aumentan y asociado con este evento, las concentraciones de estrógenos circulantes bajan inmediatamente después de la ovulación. Siguiendo a la ruptura del folículo, este se transforma en un cuerpo lúteo que viene a ser funcional bajo la influencia de la prolactina pituitaria y la producción de LH es aparentemente inhibida por las altas cantidades de progesterona producidas por el cuerpo lúteo (3, 9, 15).

2.- GESTACION

Cuando el cervix y la vagina son estimulados durante el estro, por medio del coito, la producción de prolactina por la adenohipofisis habilita al cuerpo lúteo para que se secrete progesterona. Esta secreción continúa por 10-14 días aproximadamente y al ocurrir la fertilización se desarrolla la placenta y ésta asume la producción de progesterona (8, 9).

El periodo de gestación en la rata de laboratorio tiene una duración promedio de 21-23 días (9).

Durante este tiempo no maduran nuevos folículos, no se presenta el calor y el útero experimenta algunos cambios como pueden ser que el endometrio se sensibiliza para la implantación y las glándulas uterinas aumentan de tamaño para la producción de leche uterina.

A causa de la secreción de progesterona la secreción vaginal exhibe un típico diestro con invasión de leucocitos y el ciclo es abolido. La glándula mamaria y el pezón se desarrollan pronunciadamente por el catorceavo día (9).

3.- PSEUDOGESTACION

La pseudogestación es caracterizada por el alargamiento del diestro durante trece días o más, entre calos sucesivos. Esto se puede producir por estimulación mecánica o eléctrica del cervix o la vagina, durante el estro. En esta pseudogestación el endometrio producirá una célula desidual exagerada que reaccionará a varios traumas no específicos del cuarto al séptimo día de pseudogestación en la rata. La cual está relacionada a la secreción de progesterona por un cuerpo lúteo persistente (8, 9).

D.- IMPLANTACION RETARDADA

En algunas especies como lo son el venado, los roedores y algunos carnívoros, se ha observado que después de que el blastocisto pasó al lumen uterino, existe una prolongación del tiempo, antes de que llegue a implantarse y la actividad mitótica y el desarrollo del blastocisto cesa relativamente. Esta extensión del tiempo en el periodo de preimplantación se conoce como Implantación Retardada (3, 5, 9).

En la rata normalmente, los embriones tardan en pasar a través del oviducto tres días y en el cuarto día de preñez entran al útero. Del día cuatro al día cinco los embriones descansan libres en la cavidad uterina y en este tiempo sufren una transformación de mórula a blastocisto. En la tarde del día cinco comienza la adherencia de los blastocistos al epitelio uterino y esto se considera como el inicio de la implantación. Se toma como día uno el día de detección del tapón vaginal (6, 7, 9, 18, 23).

Si una rata se aparea durante el primer estro post-parto y está amamantando seis o más crías, los blastocistos generalmente no se implantan el día cinco sino que vienen a implantarse de dos a catorce días después, este es un ejemplo de Implantación Retardada en forma natural (7, 16).

Durante el periodo de la demora de la implantación los blastocistos descansan libres en el lumen uterino donde ellos llegan a tener un tamaño un poco más grande y su actividad mitótica y desarrollo cesa relativamente, además se presentan cambios cuantitativos de algunas de

las estructuras finas, tanto de la masa de las células interiores como en las células trofoblásticas (7).

En la rata, la implantación puede ser demorada experimentalmente, si se ovariectomiza bilateralmente al animal en el segundo o tercer día de pseudopreñez y se le administra diariamente inyecciones de progesterona (6, 7, 16, 18, 23).

En el presente trabajo, durante el periodo de Implantación Retardada, nos referiremos a los blastocistos como blastocistos latentes y al útero como útero latente.

Los factores primarios, aparentemente responsables de la transformación de un útero de una hembra cíclica, a un útero latente, (útero de implantación retardada en el que el blastocisto es mantenido en condición latente), son: inducción de preñez y pseudopreñez, seguida de la ovariectomía bilateral y subsecuentes inyecciones de progesterona diariamente (6, 16, 19)

III OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el de evaluar si un animal de laboratorio, como lo es la rata blanca (raza Wistar), es capaz de preservar en su lumen uterino, por un periodo de hasta diez días, embriones que le han sido transferidos en el tercer día posterior a una ovariectomía bilateral y recibiendo un tratamiento externo de progesterona.

IV MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo, se utilizaron embriones de rata blanca de laboratorio, como modelo, con una posible extrapolación a embriones de otras especies. Las razones por las que se utilizaron embriones de rata son las siguientes:

- Lo económico que resulta la obtención de los embriones.
- La corta duración del ciclo estrual en la rata.
- La basta información que se cuenta en cuanto a la biología de la reproducción, de la rata, en el laboratorio donde se desarrolló el experimento.

A.- OBTENCION DE EMBRIONES

1.- DONADORAS

Se utilizaron hembras adultas virgenes de raza Wistar, pesando entre 180-240 gramos, a las cuales se les realizó frotis vaginal diariamente por lo menos durante tres ciclos, para ver la duración promedio de

su ciclo, el cual fue de 4 ó 5 días. Posteriormente, en la fase de estro, se pusieron con machos fértiles y la presencia del tapon vaginal o espermatozoides en la mañana siguiente, confirmaba su coito (día 1 de gestación).

El día 5 de gestación fueron sacrificadas por medio de dislocación cervical y en la zona ventral se les realizó antisepsia con una solución de benzal al 0.1% para posteriormente efectuar la incisión en forma de "V" en esta región, con la finalidad de exponer el aparato reproductor.

Posteriormente, se disecan los oviductos así como el útero y se colocan en una solución salina estéril. Para obtener los embriones se perfunden los oviductos en su región fíbrica utilizando una aguja del número 27 y pinzas de relojero.

Para lograr perfundir completamente el órgano, se requiere aproximadamente de 1-2 ml. de medio. El líquido de perfusión se colecta en vidrios de reloj para su posterior observación al microscopio.

El medio de perfusión utilizado fué una solución de fosfatos de Dulbeco estéril, suplementada con glucosa (1 gr./lt.), piruvato de sodio (28 gr./lt.) penicilina (100 UI) y suero de rata (20 %).

Todos los embriones colectados, se lavan con el medio de perfusión, por lo menos una vez antes de ser transferidos y se clasifican tomando en cuenta las siguientes características:

- Regularidad embrionaria.
- Tamaño del embrión.
- Esfericidad del embrión.
- Fisuras en la zona pelúcida.
- Tamaño del espacio perivitelino.
- Presencia de restos celulares en el espacio perivitelino.
- Integridad morfológica de los blastómeros.
- Número de blastómeros no integrados.

2.- RECEPTORAS

En el caso de las hembras receptoras, fueron animales con las mismas características que las donadoras.

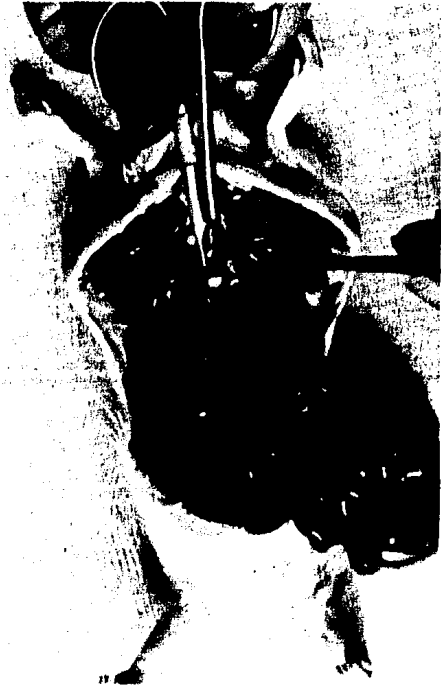
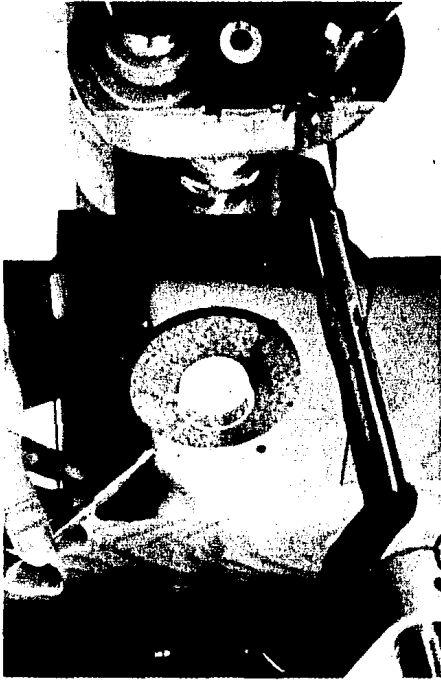
Lo que difiere de estas es que se colocaron con machos vasectomizados en lugar de colocarlos con machos fértiles, esto con la finalidad de obtener animales pseudogestantes.

A estas, en el segundo día de pseudopreñez, se les realizó la ovariectomía de forma bilateral, de la siguiente manera; se anestesiaron con éter y se les realizó antisepsia en la región lateral del abdomen, posteriormente se les hizo una incisión de aproximadamente 1 cm. de largo, en forma paralela al fémur, y con unas pinzas de disección se localizó el cuerno uterino se expone este y siguiendolo se localiza el ovario.

Ya expuesto el ovario se le realiza una ligadura en la unión útero-tubárica con catgut de 0000, y se extirpa el ovario junto con el oviducto, después se procedió a cerrar la pared abdominal y piel con seda de 000 y el otro ovario se extirpó utilizando la misma técnica. Se les administró una dosis de penicilina (2000-2500 UI) y 2 mg de progesterona subcutáneamente, desde el día de la ovariectomía hasta el día del sacrificio.

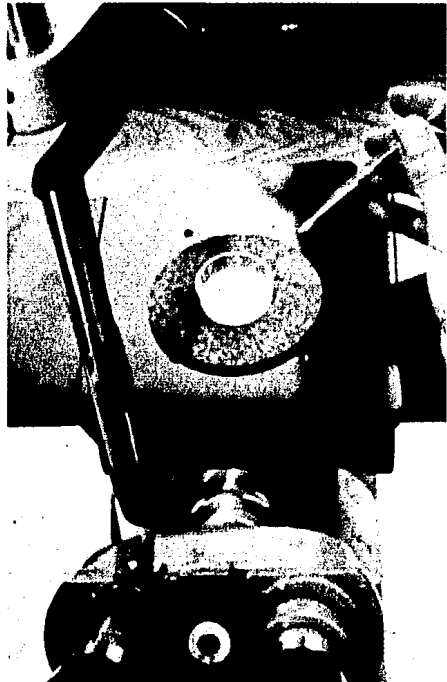
LAMINA FOTOGRAFICA I

- a) Fotografía que muestra una hembra sacrificada, con la incisión en forma de "V" en la región ventral.
- b) Fotografía que muestra la exposición del útero y su forma de disecarlo.
- c) Fotografía que muestra la manera de perfundir el órgano para la colecta de los embriones.
- d) Fotografía que muestra la manera de identificar los embriones y su clasificación en cuanto a su morfología.



LAMINA FOTOGRAFICA

LAMINA FOTOGRAFICA



B.- TÉCNICA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Al tercer día de la ovariectomía (5^o día de pseudopreñez) se les realizó el transplante de embriones a las ratas receptoras por medio de una simplificación de la técnica descrita por Noyes y Dickmann (17).

Los embriones para ser transferidos se colocaron en una micropipeta con 0.0001-0.0005 ml de medio aproximadamente. Las receptoras fueron anestesiadas con éter y su cuerno uterino fue expuesto por medio de una insición que se realizó paralelamente a la que se hizo en la ovariectomía. El cuerno uterino fue sostenido con el dedo índice y pulgar y la pared antimesometrial del útero fue puncionada con una aguja fina de cirugía para crear un paso hasta el lumen uterino. Entonces la micropipeta fue insertada a través de este pasaje y los blastocistos fueron depositados en el lumen uterino, en un número de cuatro blastocistos por cuerno uterino. Después que las transferencias fueron hechas, la pared abdominal y la piel fueron cerradas con seda de 000 y se les continuó el tratamiento de progesterona hasta el día del sacrificio.

En el presente trabajo se realizaron tres grupos, de cinco animales de cada grupo, con la finalidad de observar los porcentajes de recuperación embrionaria y evaluación morfológica de los mismos, cuando los embriones huéspedes (blastocistos latentes) permanecieron en el lumen uterino de la rata receptora (útero de implan-tación retardada) por un lapso de 3, 5 y 10 días.

C.- RECUPERACION DE EMBRIONES

Los embriones se recuperaron después de haber per-manecido, en el lumen uterino de la rata receptora 3, 5, y 10 días. Esta recuperación embrionaria se realizó de la misma manera como se obtuvieron los embriones de las ratas donadoras.

Los embriones recuperados se observaron al micros-copio para evaluarlos de acuerdo a las características con que se evaluaron los embriones de las ratas donado-ras.

LAMINA FOTOGRAFICA II

- a) Fotografía que muestra el ovario expuesto, para su posterior disección.

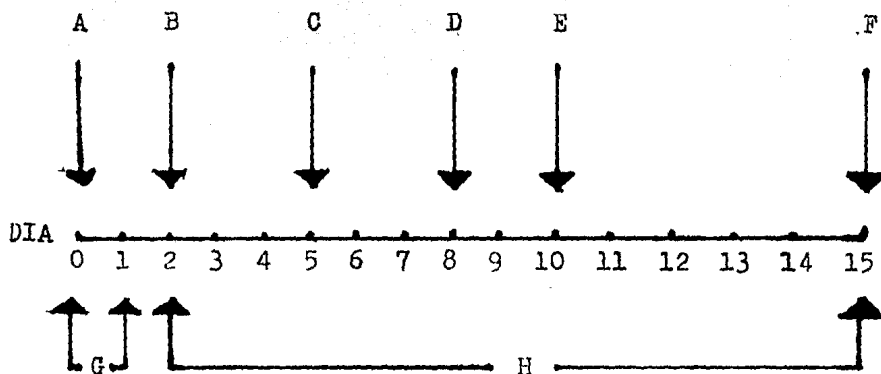
- b) Fotografía que muestra el útero expuesto, para su punción que facilitará la entrada de la micropipeta de transferencia.

- c) Fotografía que muestra el momento de la transferencia de los embriones en el lumen uterino.

LAMINA FOTOGRAFICA



Fig. 1.- Secuencia del Tratamiento en las Ratas Receptoras.



- A.- Detección de Proestro.
- B.- Ovariectomía Bilateral.
- C.- Transferencia de Blastocistos.
- D.- Recolección de Blastocistos, del Grupo "A".
- E.- Recolección de Blastocistos, del Grupo "B".
- F.- Recolección de Blastocistos, del Grupo "C".
- G.- Estimulación Cervical con Machos Vasectomizados.
- H.- Tratamiento de Progesterona, 2 mg/día.

V RESULTADOS

Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, se resumen en la tabla 1 y son los que se describen a continuación, para los tres diferentes grupos:

GRUPO 1

En este como en los otros dos grupos, se transplantaron cuatro embriones (en la etapa de blastocistos), por cada cuerno uterino, dando un total de 40 embriones transplantados por grupo.

En este grupo, el tiempo de permanencia de los embriones en el lumen uterino de las ratas receptoras, fué de tres días. Al término de estos tres días, las ratas fueron sacrificadas y de los 40 embriones que se transplantaron, se recolectaron 27 embriones, que tenían la misma morfología que los blastocistos elongados de manera natural en el sexto día de embarazo. Los 27 embriones que se colectaron nos representan un 67.5% del total de los embriones que se transplantaron.

GRUPO 2

En este grupo, de los 40 blastocistos que se transplantaron se recolectaron 12, después de que estos perma necieron 5 días en el lumen uterino de la rata receptora.

Estos 12 blastocistos que se recuperaron, nos repre sentan un 30% de recuperación embrionaria para un tiempo de cinco días de permanencia en la rata receptora. Ver gráfica 1.

GRUPO 3

En este grupo, después de que los embriones perma necieron 10 días en el lumen uterino de la rata recepto ra, solo se lograron recunerar 4 blastocistos, que nos representan el 9.4% de recuperación embrionaria. Ver gráfica 1.

ALMACENAMIENTO DE EMBRIONES DE RATA
EN ANIMALES OVARIECTOMIZADOS

100 μ m

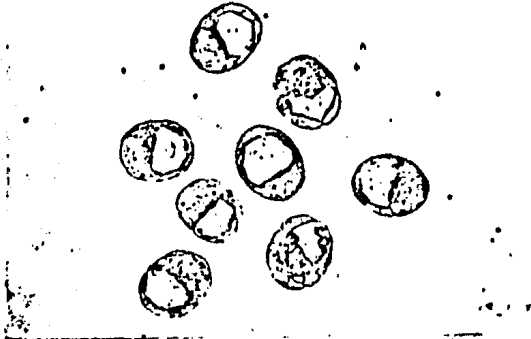


FIG 1 BLASTOCISTOS CON ZONA PELÚCIDA COLECTADOS
EN EL QUINTO DÍA DEL EMBARAZO.

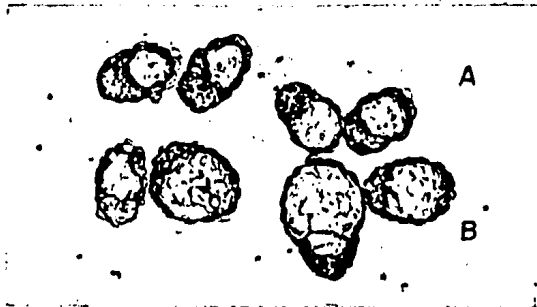


FIG 2 A) BLASTOCISTOS SIN ZONA PELÚCIDA COLECTA-
DOS EN EL QUINTO DÍA DEL EMBARAZO.

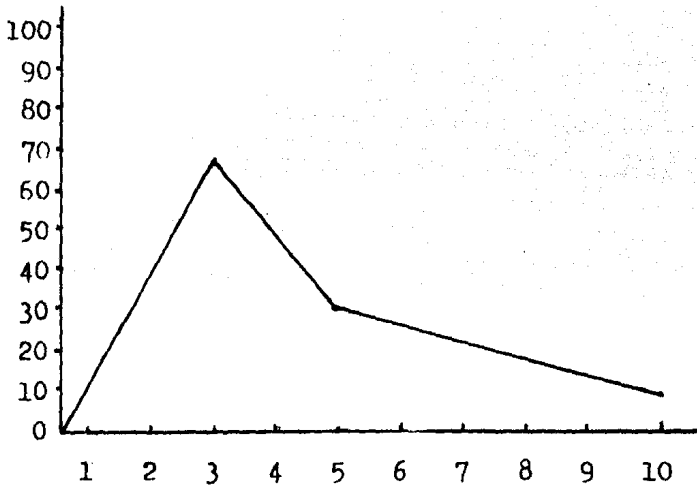
B) BLASTOCISTOS SIN ZONA PELÚCIDA COLECTA-
DOS DESPUÉS DE 3, 5 Y 10 DÍAS DE EMBARAZO.



FIG 3 BLASTOCISTOS SIN ZONA PELÚCIDA COLECTADOS
DESPUÉS DE 3, 5 Y 10 DÍAS DE ALMACENAMIENTO.

Grafica 1: Porcentaje de Recuperación Embrionaria en Relación al Tiempo de Estancia en el Utero de Implantación Retardada.

% de Recuperación Embrionaria



Tiempo de Permanencia de los Embriones en Utero de Implantación Retardada (Días).

Grafica 2: Porcentaje Comparativo de Recuperación Embrionaria en los Tres Diferentes Grupos.

% de Embriones Recuperados

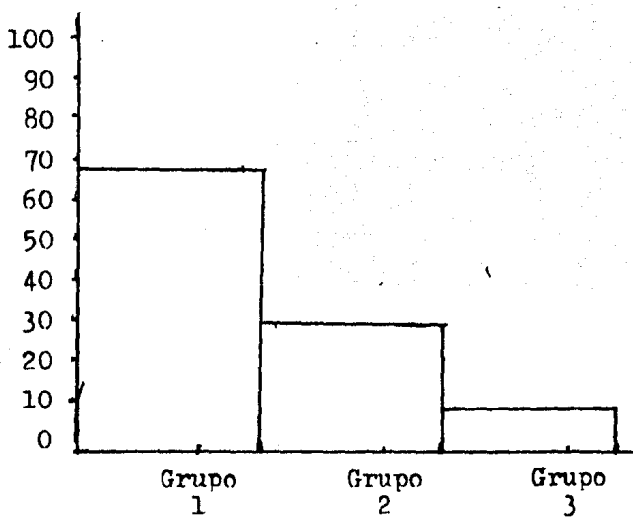


TABLA 1: SUPERVIVENCIA DE BLASTOCISTOS EN UTERO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS.

Grupo Núm.	Núm. de Ratas por Grupo	Núm. de Blastocis- tos que se Transplanta- ron por Grupo	Tiempo de Permanencia en el Utero de la Rata (DIAS)	Total de Blastocis- tos Recu- perados	Por ciento de Recuperación
1	5	40	3	27	67.5%
2	5	40	5	12	30%
3	5	40	10	4	9.4%

VI DISCUSION

Durante el desarrollo del presente experimento se observó que el útero de la rata de laboratorio (raza Wistar), se puede utilizar para almacenar y transportar embriones demorando la implantación de estos. Si se ovariectomiza bilateralmente al animal y posteriormente se le da un tratamiento externo de progesterona. Tal como lo demuestran los resultados que al permanecer los embriones durante tres días en el útero de implantación demorada se obtuvo un 67.5% de recuperación embrionaria, a los ocho días un 30% de recuperación y a los 10 días un 9.4%.

Dickmann (1967), nos reporta que la remoción de los ovarios, seguida del tratamiento de progesterona, neutraliza un factor detrimental para los blastocistos, además concluye que el tratamiento de progesterona, por cinco días antes de que se transplanten los embriones, es suficiente para suprimir completamente el efecto de los estrógenos endógenos, cuando la ovariectomía se realizó el día dos de pseudopreñez. Obteniendo un 58% de recuperación embrionaria después que estos permanecie-

ron tres días en el útero de implantación demorada.

Yoshinaga (1966), nos reporta que una ovariectomía en los primeros 4 días de pseudopreñez, nos lleva a una implantación demorada en diversos grados. Un retraso en la implantación fué notado en 5-8, 6-9, 8-8 y 2-7 de los ratones ovariectomizados en los días 1, 2, 3 y 4 de pseudopreñez respectivamente y la ovariectomía el día 5 seguida de tratamiento de progesterona no interfirió en la implantación.

Mc Laren (1971), nos menciona que el tratamiento diario con una pequeña dosis de progesterona en el tercer día de la ovariectomía altera la apariencia del útero y no permite la implantación hasta que se administran estrógenos. Con 2.5 mg de progesterona diariamente la ovariectomía en el primer día de pseudopreñez resulta virtualmente en implantación demorada, pero una ovariectomía en cualquiera de los 3 días subsecuentes, le dió un porcentaje de implantación no tan significativo como en las hembras intactas.

Este autor nos sugiere una posibilidad de una reac

ción sinérgica entre la progesterona y los estrógenos en el sentido de que una pequeña dosis de estrógenos puede sustancialmente reducir la cantidad de progesterona requerida para inducir la implantación.

Por otro lado Weitlauf (1968), en su experimento nos demuestra que un pequeño porcentaje de blastocistos de ratones, prevenidos de la implantación, por medio de la ovariectomía simplemente, puede permanecer viable durante 10 días a pesar de la ausencia de las hormonas ováricas y demuestra su viabilidad por medio de lugares de implantación o el desarrollo fetal.

VII CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- 1.- El porcentaje de recuperación embrionaria que se tiene se ve disminuido conforme se alarga el tiempo de estancia de los embriones en el útero de implantación retardada.
- 2.- Es necesaria la ovariectomía bilateral con tres días de anticipación mínimo y dar tratamiento de progesterona diariamente, desde el día de la ovariectomía hasta el día de la colecta de los embriones, para que estos puedan permanecer en forma latente en el útero de Implantación Retardada.
- 3.- El fallo para encontrar blastocistos no implantados o alguna reacción desidual, puede estar relacionado con reabsorción embrionaria o alguna implantación abortiva.

Estas conclusiones nos sugieren que existen algunas

alternativas para la implantación, sin estrógenos o que los animales ovariectomizados pueden tener algún abastecedor de estrógenos. Una ovariectomía incompleta la podemos deshechar en este trabajo.

Otra posibilidad puede ser la presencia de estrógenos en el alimento, o la conversión de progesterona exógena a estrógenos en algún lugar del cuerpo y la presencia residual de estrógenos.

Con los presentes resultados y con los de investigaciones próximas, en donde se emplearán embriones interspecíficos, nos ayudarán para determinar si la rata de laboratorio puede emplearse como vehículo de almacenaje y transporte de embriones de mamíferos.

VIII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allen, W.R., Stewart, F., Trounson, A.O., Tischner, M. and Bielanski, W. 1967. Viability of horse embryos after storage and long distance transport in the rabbit. *J. - Reprod. Fert* 47: 387-390.
- 2.- Averill, R.W. and Rawson, L.E.A. 1959. Attempts at storage of sheep ova at low temperatures. *J. Agric. Scie.* 52: 392-395.
- 3.- Blatcheley, F.R. and Donovan, B.T. 1976. Progesterone secretion during pregnancy and pseudopregnancy in the ferret. *J. Reprod. Fert.* 46: 455-456.
- 4.- Bursk, J. L., Davis, M.E., and Baker, J.J. 1965. Morphologic evaluation of frozen Rabbit - and Human ova *Fertil.* 16: 638-641.
- 5.- Cook, B. and Hunter, R.H.F. 1878. Systemic and local hormonal requirements for implantation in domestic animals. *J. Reprod. Fert.* 54: 471-482.

- 6.- Dickmann, Z. 1967. Hormonal Requeriments for the survival of blastocysts in the uterus of the rat. J. Endoer. 37: 455-461.
- 7.- Dickmann, Z. and De Feo J. 1967. The rat blastocist during normal Pregnancy and during de-layed implantation, including an obser-vation on the shedding of the zona pe-llucida. J. Reprod. Fert. 13: 3-9.
- 8.- Farris J. E. and Friffith, J. Q. 1971. The rat in laboratory investigation, pags. 51-67, 2^a ed., cap. 4 Hatner publishing com-pany.
- 9.- Hafez, ESE. Reproduction and Breeding techniques to laboratory animals. Ith Ed. Lea and Febiger Philadelphia. 1970.
- 10.- Heape, W. 1890 Preliminary note on the transplan-tation and growth of mammalian ova within an uterine foster-mother Proc. Roy Soc. London. 48: 457-458.

- 11.- Hunter GL, Bishop GP., Adams GE., and Rowson LE.
1962. Successful Long-distance aerial
01- Fertilized Sheep ova J. Reprod
Fert. 3: 33-40.
- 12.- Lawson RAS., Adams E. Romson L.E.A. 1972. The
Development of sheep eggs in the rabbit
oviduct and their viability after
re-transfer to heifers J. Reprod Fert.
29: 105-116.
- 13.- Lawson RAS, Romson LEA Adams GE. 1972 The develop
ment of come eggs in the rabbit oviduct
and their viability after re-transfer
to heifers J. Reprod Fert. 23: 313-315.
- 14.- Maurer RR. 1978. Freezing a Mamalian embryos a review
of the techniques. Teriogenology.
9: 45-68.
- 15.- Me. Donal L.E. Reproducción y Endocrinología Vete-
rinas 2^a Ed. Interamericana. Cap. 10
pags. 236-285. 1967.

- 16.- Mc., Laren. 1971 Blastocyst in the mouse uterus:
The effect of ovariectomy progesterone
an estrogen. J. Enocr. 50: 515-526.
- 17.- Noyes R.W., Dickman Z. 1960. The fate of ava trans
ferred in to the uterus of the rat. J.
Reprod. Fert. 1: 197.
- 18.- Orsini M.W. and Meyer R. 1962. Effect of varying
dose o progesterone on implantation
in the ovariectomized Hamster. Proc.
Soc. Exp. Biol. Med. 110: 713-715.
- 19.- Roblero L. and Izquierdo L. 1967. Effect of proges
terone on the cleavage rate of mouse
embryos in vitro. J. Reprod. Fert. 46:
475-476.
- 20.- Sorensen AM. Jr. Reproducción Animal, Principios
y Prácticas. (ap. 13 pags. 359-385.2^a
ed. Mc. Graw Hill de México S.A. de C.V.
1982

- 16.- Mc., Laren. 1971 Blastocyst in the mouse uterus:
The effect of ovariectomy progesterone
an estrogen. J. Enocr. 50: 515-526.
- 17.- Noyes R.W., Dickman Z. 1960. The fate of ava trans
ferred in to the uterus of the rat. J.
Reprod. Fert. 1: 197.
- 18.- Orsini M.W. and Meyer R. 1962. Effect of varying
dose o progesterone on implantation
in the ovariectomized Hamster. Proc.
Soc. Exp. Biol. Med. 110: 713-715.
- 19.- Roblero L. and Izquierdo L. 1967. Effect of proges
terone on the cleavage rate of mouse
embryos in vitro. J. Reprod. Fert. 46:
475-476.
- 20.- Sorensen AM. Jr. Reproducción Animal, Principios
y Prácticas. (ap. 13 pags. 359-385.2^a
ed. Mc. Graw Hill de México S.A. de C.V.
1982

- 21.- Trounson A.B., Willadsen SM. and Rowson LEA. 1976
The influence of in vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. J. Reprod. Fert. 47: 367-370.
- 22.- UTESA. Memorias del 2^o curso de transplante de embriones. 1982.
- 23.- Weitlauf HM. and Greenwald GS. 1968. Survival of blastocyst in the uteri of ovariectomized mice. J. Reprod. Fert. 17: 515-520.
- 24.- Whittingham DG. and Witten WT. 1974. Long Term storage and aerial transport of frozen mouse embryos. J. Reprod. Fert. 36: 433-434.
- 25.- Yoshinaga K. and Adams CE. 1966. Delayed implantation in the spayed progesterone treated adult mouse. J. Reprod. Fert. 12: 593-595.

- 21.- Trounson A.B., Willadsen SM. and Rowson LEA. 1976
The influence of in vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. J. Reprod. Fert. 47: 367-370.
- 22.- UTESA. Memorias del 2^o curso de transplante de embriones. 1982.
- 23.- Weitlauf HM. and Greenwal GS. 1968. Survival of blastocyst in the uteri of ovariectomized mice. J. Reprod. Fert. 17: 515-520.
- 24.- Whittingham DG. and Witten WT. 1974. Long Term storage and aerial transport of frozen mouse embryos. J. Reprod. Fert. 36: 433-434.
- 25.- Yoshinaga K. and Adams CE. 1966. Delayed implantation in the spayed progesterone treated adult mouse. J. Reprod. Fert. 12: 593-595.