

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



VALORACION DE LA SOLUCION HARTMANN COMO MEDIO DE RECOLECCION DE EMBRIONES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

DAVID BERROA PINZON

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Contenido	Página
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	2
A.- Factores Físicos y Ambientales	3
1.- Temperatura	3
2.- Luz	4
3.- Presión ósmotica	4
4.- Variaciones de pH	5
5.- Microorganismos	6
6.- Equipo	7
B.- Composición de un Medio de Colecta para Embriones	7
1.- Composición iónica	7
2.- Composición energética	8
3.- Composición proteíca	9
III.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	10
IV.- HIPOTESIS	10
V.- MATERIAL Y METODOS	10
A.- Obtención de Embriones	11
B.- Medios de Colecta de Embriones	12
C.- Estudios del pH de los Medios de Colecta	13
D.- Estancia Embrionaria	14
VI.- RESULTADOS Y DISCUSSION	15
A.- Variación del pH de los Medios de Colecta	15
B.- Viabilidad Embrionaria	15
1.- Características morfológicas de los Embriones a temperatura Ambiente	16

2.- Características morfológicas de los Embriones a Temperatura Fisiológica	16
3.- Estudio fotográfico	22
VII.- CONCLUSIONES	28
VIII.- BIBLIOGRAFIA	29

I.- RESUMEN

La técnica de transferencia de embriones es actualmente una herramienta que se emplea para aumentar el potencial reproductivo de los animales domésticos, sin embargo, debido a su alto costo no ha tenido una gran difusión. Tomando en cuenta lo anterior se pensó en realizar el siguiente trabajo con el objetivo de tratar de disminuir en lo posible el costo de los medios que se emplean para la colecta de embriones.

Así, este estudio se encaminó a valorar a la solución Hartmann (HT) suplementada, como un medio alternativo para la recolección de embriones y teniendo a la solución fosfatada de Dulbecco (PBS) como medio de control. Ambas soluciones fueron suplementadas con sueros de diversos orígenes, adicionando además a PBS, glucosa, piruvato de sodio y antibióticos.

Se estudiaron un total de 1200 embriones de rata en el estado de blastocisto, los cuáles fueron colocados a temperatura ambiente y corporal por un lapso de hasta nueve horas en ambas soluciones (HT, PBS), al término del cual se le realizaron estudios morfológicos para determinar de manera indirecta si su viabilidad había sido o no modificada por su permanencia tanto en los medios problema como en el testigo.

Analizando los resultados obtenidos, se puede concluir que la solución HT suplementada es igual de eficiente que la solución PBS como medio de colecta para los embriones de rata.

II.- INTRODUCCION

La técnica de transferencia de embriones no es algo reciente, pero sí ha tomado mucha difusión en la última década y está revolucionando los sistemas de producción del mundo con el objeto de producir más y mejores alimentos de origen animal. (25)

Es un instrumento que al igual que la inseminación artificial, está encaminada a la manipulación de los genes y por lo tanto, con la aplicación de esta tecnología es posible lograr el avance genético de un hato a corto plazo, explotando al máximo el potencial reproductivo de un animal que por sus características es superior a los demás y por ende, muy valioso; Obtener el nacimiento de productos con el potencial hereditario de sus progenitores y la resistencia al medio de su madre adoptiva. También nos da la solución de algunos problemas de infertilidad y esterilidad, al lograr que animales en ésta situación conciban y nos den crías. (32)

La metodología involucra pasos simples pero que requieren de personal capacitado, y el éxito en la transferencia embrionaria depende de diversos factores como por ejemplo: (2,7,24,26) -

- a.- Destreza del técnico
- b.- Selección adecuada de las técnicas para recolección y transferencia .
- c.- Sincronización de las donadoras y receptoras
- d.- Fertilidad de las donadoras
- e.- Calidad del esperma

f.- Identificación y evaluación del potencial biológico de los embriones.

g.- Nutrición y manejo de los animales.

Las soluciones salinas modificadas para medios de recolección embrionaria y más conocidas a la fecha son:

PBS, TCM - 199, F-10 de Ham, B - 2 de Menezo y el BMOC - 3; - Necesitando los tres últimos de atmósferas de dióxido de carbono y oxígeno para estabilizar su pH y que se puedan utilizar para - tal fin, (9, 25, 26,27,38)

A.- Factores Físicos y Ambientales

Se consideran como principales factores físicos y ambientales que pueden afectar la viabilidad de los embriones: (21,30)

- 1.- Temperatura
- 2.- Luz
- 3.- Presión osmótica
- 4.- Variaciones de pH
- 5.- Microorganismos
- 6.- Equipo

1.- Temperatura

La temperatura es uno de los puntos importantes que van a determinar la velocidad de los procesos metabólicos en el embrión.

Ya que se ha visto que embriones colocados fuera del rango fisiológico de 37 a 38 °C, van a disminuir o suspender dichos procesos. (33,37,39)

2.- Luz

La casi totalidad de las células que integran un organismo se encuentran en la obscuridad, por lo que cuando se ven expuestas a la luz, las diversas longitudes de onda que la componen - (ultravioleta, e infrarrojos principalmente), van a traer por consecuencia efectos deletéreos sobre el desarrollo celular. - lo cual es extrapolable para los embriones de mamífero, por lo que se recomienda tomar las precauciones adecuadas al respecto, como lo sería el empleo de filtros verdes o rojos en las fuentes de iluminación. (19)

3.- Presión osmótica

La presión osmótica es la fuerza generada por el paso de moléculas de un solvente desde el punto de menor al de mayor concentración de soluto, cuando dos soluciones están separadas por una membrana que impide en forma selectiva el paso de moléculas de soluto, pero que es permeable al solvente. Las soluciones isotónicas o isosmóticas tienen una osmolaridad de 0.308 ósmoles y son las que poseen concentraciones idénticas de soluto y solvente, y por lo tanto la misma presión osmótica que la solución con la cual se compara. (34)

La osmolaridad fisiológica en la cual se desarrollan los embriones de mamíferos va de 270 a 311 miliosmoles aproximadamente teniendo como valores intermedios de este rango las concentraciones óptimas para los embriones de diferentes especies. Una ma - nera sencilla de apreciar prácticamente la osmolaridad del medio es, observando el comportamiento de los eritrocitos y apreciar - en ellos su morfología: la cual se modificará según la osmolaridad del medio en que se encuentran, tendiente a la crenocitosis si el medio es hipertónico y a la hemólisis si el medio es hipotónico. (4,26)

Teniendo en cuenta lo anterior, se debe de tener mucho cuidado de evitar en lo posible la evaporación del medio de colecta durante la estancia del embrión fuera del ambiente materno, ya que de lo contrario, traería como consecuencia un aumento en la concentración de las sales del medio y por tanto la pérdida del agua citoplásmica embrionaria.

4.- Variaciones de pH.

Se denomina pH a la concentración de iones hidrogenión e - hidroxilos presentes en una solución. El valor que se considera como fisiológico, esto es, el punto en que las células pueden - desarrollar sus funciones enzimáticas mejor, es de 7.2 a 7.4; - no obstante, pueden tolerar variaciones hacia la acidez (pH de - 6.6) o de alcalinidad (pH de 7.8). (4,19)

Al igual que en el inciso anterior, los embriones de mamíferos se desarrollan normalmente dentro de los valores fisiológicos, aunque pueden soportar las variaciones fuera de este rango por períodos breves sin que su viabilidad se vea afectada; - esto es, de un pH de 5.87 hasta un valor cercano a 7.80, principalmente para embriones de ratón en etapas tempranas. (5,26,36).

5.- Microorganismos

Se considera como microorganismos que pueden afectar la viabilidad embrionaria, a los hongos y bacterias; más específicamente a sus productos de desecho. (10, 18)

Es frecuente que en los procedimientos de transferencia de embriones que se llevan a cabo en el campo, se encuentran sujetos a una posible contaminación por los microorganismos procedentes de las excretas de los animales; por lo que se recomienda tomar en consideración los siguientes puntos:

- a.- Adicionar antibióticos al medio de colecta (penicilina-estreptomina)
- b.- Filtrar el medio de colecta a través de poros cuyo diámetro no sea mayor de 0.45 micrómetros
- c.- Esterilizar en autoclave todo el material de cristalería - que se emplee.
- d.- Procurar que la estancia de los embriones fuera del ambiente materno no sea muy prolongada, lo cual impediría en cierta medida que los microorganismos que pudieran haber contaminado el medio secretaran sustancia que podrían considerarse como embriotóxicas.

e.- Tomar todas las precauciones de asepsia y esterilidad posibles.

6.- Equipo

El empleo de material de cristalería de calidad (pyrex, kimax etc.), es recomendable para las técnicas de colecta de embriones porque, de lo contrario traería como consecuencia la lixiviación de iones metálicos de las paredes de los recipientes hacia el medio. Así mismo, se debe de tomar en cuenta que el material y equipo que entrarán en contacto con los embriones se tiene que lavar previamente con soluciones detergentes y al final, antes de que se seque enjuagarlo perfectamente con agua bidestilada por lo menos unas cinco veces, con la finalidad de evitar la presencia de sales indeseables. (26)

B.- Composición de un Medio de Colecta para Embriones

Un medio de colecta para embriones de mamífero debe de estar formado por tres partes que son:

- 1.- Composición iónica
- 2.- Composición energética
- 3.- Composición proteica

1.- Composición iónica

Las composiciones iónicas que forma un medio de colecta -

embriones, son aquellas sales que generalmente integran una solución salina; y que se usan con el fin de mantener la isotonicidad y a veces el Ph de los líquidos intra y extracelulares - (17) .

Dentro de esta variedad de sales cabe resaltar a las siguientes, las cuales juegan un papel importante en el metabolismo normal embrionario: (4,19)

- a.- NaCl : Esta, le daría de manera importante la concentración ósmótica que va a tener el medio de colecta. (4)
- b.- KCl : Los iones , tanto de K como de Na (de la solución anterior) van a participar de manera importante en el proceso de transporte activo que se desarrolla a lo largo de la membrana citoplasmática. (5,8,16)
- c.- CaCl y MgCl : Los iones Ca y Mg intervienen en los procesos de compactación de los blastómeros y por tanto en la diferenciación embrionaria. (3,19,20,23,33,37)
- d.- NaH_2PO_4 y KH_2PO_4 : Los iones fosfato además de intervenir en los procesos de síntesis proteica, juegan un papel primordial en la regulación de la acidez-alcalinidad del medio. (4,9,16)

2.- Composición energética

Principalmente son tres las fuentes energéticas que se emplean en los medios para colecta de embriones, estas son el piruvato de sodio, láctato de sodio y la glucosa; aunque también se han empleado en menor proporción, fuentes tales como el oxaloacétato y los ácidos grasos. (13,16)

De las fuentes mencionadas anteriormente, se ha visto que solo la glucosa no se puede emplear para la colecta o cultivo de los estadios embrionarios anteriores al de ocho células; debido, a que no existen en estas etapas las enzimas adecuadas para degradar este azúcar. (3,6,22)

3.- Composición protefca

Las fuentes protefcas que se emplean más comunmente en los medios de cultivo o colecta de embriones proceden principalmente del suero sanguíneo y mejor aún, si vienen de animales de la misma especie de la cual sean los embriones a trabajar (suero -homólogo). Al suero antes de combinarlo con el medio, se le debe desactivar el complemento, calentandolo a 56 °C por treinta minutos. (19,35)

Además del aporte protefco y hormonal del suero se ha visto, que este le proporciona cierta densidad al medio que lo contiene, lo cual hace que los embriones no se adhieran a la superficie de los recipientes, y precipiten al fondo de los mismos - (1,20,23,24,31).

La función anterior, la suministra también la albumina que es una proteína que se encuentra en una cantidad del 60 % aproximadamente en el suero sanguíneo. Dentro de otras funciones - que desempeña esta proteína, se encuentra la de ser acarreador de hormonas y una fuente de provisión de aminoácidos para el embrión. (6,8,11,15)

III.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

El objetivo del presente trabajo está encaminado a estudiar la solución HT como un medio alternativo de bajo costo y fácil adquisición para la recolección de embriones; debido, a que la solución PBS que de manera tradicional se ha venido empleando para tal fin, no solamente es difícil de obtener ya que es un producto de importación, si no, que la elaboración por medio de sus sales de manera individual resulta además de caro, poco práctico.

IV.- HIPOTESIS

Si la composición iónica y energética de la solución HT es semejante a la solución PBS, que se emplea comunmente para la recolección de embriones de mamíferos; se podría inferir por lo tanto, que ésta puede utilizarse para tal fin.

V.- MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se desarrollará utilizando embriones procedentes de la rata blanca de laboratorio (raza Wistar), por las siguientes razones :

- a.- Disposición de animales
- b.- Facilidad de manejo
- c.- Obtención de gran cantidad de embriones sin superovulación
- d.- Duración del ciclo estral
- e.- Economía

Para lo cual se disponía de una colonia de 200 ratas hembras y 20 machos, cuyas edades oscilaban entre los tres y cuatro meses; por lo que se trabajaron más de 1200 embriones en el estadio de blastocisto y provenientes de aproximadamente 150 hembras gestantes. En primera instancia fueron detectados los proestros en las hembras mediante citología vaginal, y luego se colocaron con los machos en relación de tres hembras por cada dos machos.

A.- Obtención de Embriones

Los embriones utilizados para los dos medios de colecta fueron blastocistos, los cuales se obtienen al quinto día de embaraze del animal; considerandose como día primero, el día de la detección del tapón vaginal.

Para la obtención de los embriones se procedió de la siguiente manera: Se sacrificó al animal por medio de dislocación cervical, a su región ventral se le practicó la asépsia 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 exponer totalmente al descubierto el aparato reproductor. Se disecciona el oviducto junto con el útero y se sumerge en una solución salina estéril para la obtención de los embriones, se perfunde el oviducto en su región fimbriada utilizando una aguja del número 22 y unas pinzas de relojero.

Apróximadamente se requiere de 1 a 2 ml. del medio para lograr perfundir completamente el órgano; el líquido de perfusión se colecta en un vidrio de reloj, para su posterior observación al microscopio.

Todos los embriones colectados y clasificados como morfológicamente normales (ver tabla 1), se lavan por lo menos una vez en medio fresco antes de ser transferidos a la solución de estudio. Las operaciones de colecta y traslado de los embriones se realiza con una pipeta pasteur cuya punta posee un diámetro cercano a los 150 micrómetros, previamente siliconizada.

B.- Medios de Colecta de Embriones

Las soluciones salinas empleadas en el presente trabajo son:

- 1.- Solución Hartmann (HT), de laboratorios Abott
- 2.- Solución fosfatada de Dulbecco (PBS), de laboratorios DIFCO, suplementada con 1 g/lit de glucosa, 0.028 g/lit de piruvato de sodio, y 100 UI de penicilina G sódica.

Los suplementos séricos que se emplearon para las soluciones anteriores, se describen a continuación:

- a.- Solución Hartmann, suplementada al 0, 1 al 10, y 15 % de suero de rata (HT/RS)
- b.- Solución Dulbecco, suplementada al 1, 10, y 20 % de suero de rata (PBS/RS)

- c.- Solución Dulbecco, suplementada con 10 % de suero fetal bóvino (PBS/FCS)
- d.- Solución Dulbecco, suplementada con 0.4 % de albumina sérica bóvina (PBS/BSA)

TABLA 1 ; Características Morfológicas Tomadas en Cuenta para la Clasificación de los Embriones. (12,29)

- 1.- Regularidad embrionaria
- 2.- Tamaño del embrión
- 3.- Esfericidad del embrión
- 4.- Espesor y fisuras de la zona pelúcida
- 5.- Tamaño del espacio perivitelino
- 6.- Presencia de restos celulares en el espacio perivitelino
- 7.- Integridad morfológica de los blastómeros
- 8.- Opacidad citoplasmática de los blastómeros
- 9.- Número de blastómeros no integrados
- 10.- Grado de compactación de los blastómeros

C.- Estudio del pH de los Medios de Colecta

Débito, a que la solución HT no posee un sistema de amortiguación intrínseco y su pH es ligeramente ácido (6.35 - 6.40), se estudiará la concentración necesaria de suero que se requiere para que su pH sea fisiológico; de esta manera se procederá a suplementarla con diferentes porcentajes séricos que van desde el 1, hasta el 10 y 15 %.

De los resultados anteriores se tomara solamente aquel porcentaje sérico que le de a la solución un pH fisiológico, y se pasara a efectuar un estudio para determinar las posibles variaciones de este valor a lo largo de doce horas a temperatura y atmósfera ambiental.

Así mismo, se realizará lo anterior con la solución PBS - suplementada con 1, 10, y 20 % con suero, para considerarlo como el registro control. Los resultados obtenidos nos proporcionaran una idea de cual es la cantidad sérica adecuada para suplementar a la solución HT y la amplitud del lapso de tiempo - por la que se debe de emplear.

D.- Estancia Embrionaria

El estudio de los efectos, de los medios de colecta (HT,- PBS) sobre la viavilidad de los embriones de rata, se realizará de la siguiente forma: Una vez colectados y clasificados los embriones, se dispondrán en grupos de treinta en los medios de colecta (suplementados con diferentes porcentajes y orígenes séricos), los cuales se encuentran en cajas de Petri, de 2.5 cm. de diámetro, siliconizadas, protegidas de la luz y mantenidas a temperatura ambiente por períodos de nueve horas. Lo anterior fue repetido por cinco veces para cada uno de los medios.

El procedimiento anterior se realizó de la misma manera, - con la única diferencia de que los embriones en lugar de ser mantenidos a temperatura ambiente, fueron colocados por el mismo lapso de tiempo en el interior de una estufa de cultivo con

temperatura controlada a 37 °C, que poseía vapores de agua; y - este último proceso fue considerado como control.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio se desglosan de la siguiente manera:

A.- Variación del pH de los Medios de Colecta

En el cuadro y gráfica número 1 se presentan las variaciones de pH de la solución HT cuando se le adiciono diferentes porcentajes de suero de rata, observandose que el 5 % de suplemento sérico proporciona un valor muy cercano al fisiológico (7.0), además de que éste porcentaje no representa un gasto fuerte de este suplemento, cuando se trata de enriquecer con la misma proporción uno o más litros de solución salina.

En el cuadro número 2 se presentan las variaciones de pH - observadas de las soluciones HT y PBS suplementadas con el 1 y 5 %; 1, 10 y 20 % respectivamente. Los resultados del cuadro anterior se encuentran expresados en las gráficas N.º 2 y 3.

B.- Viabilidad Embrionaria

Como ya se menciona con anticipación, la viabilidad de los embriones de rata se determinó observando si estos sufrían cam-

bios morfológicos durante su estancia, ya sea, a temperatura ambiente (22 °C) o de cultivo (37 °C) en las soluciones HT y PBS con diferentes suplementos séricos, observandose lo siguiente :

1.- Características Morfológicas de los Embriones a Temperatura Ambiente: (Ver lámina 1 y 2)

- a.- Ninguno de los embriones estudiados tendió hacia el degeneramiento cuando se encontraron tanto en solución HT y PBS.
- b.- Ninguno de los embriones sufrió cambios morfológicos drástico cuando se encontraron tanto en solución HT como PBS.
- c.- Sólo de manera eventual se observó en el medio PBS suplementado con BSA (0.4 %) la colapsación de blastocistos, lo cual podría ser explicado por la falta de un transporte activo de iones hacia el interior del espacio blastocélico como consecuencia de la disminución metabólica sufrida por el embrión como respuesta a su estancia en un medio hipotermico; o de no, en base a las alteraciones fisiológicas, químicas, genéticas y patológicas, mencionadas por Hafez (14).

2.- Características Morfológicas de los Embriones a Temperatura Fisiológica.

- a.- Las características morfológicas embrionarias observadas bajo estas condiciones son casi las mismas que las mencionadas en el inciso número 1 anterior, con la excepción de que no hubo colapsaciones en ninguno de los blastocistos cultivados.

Cuadro No. 1

pH de la solución HT según el porcentaje de suero añadido

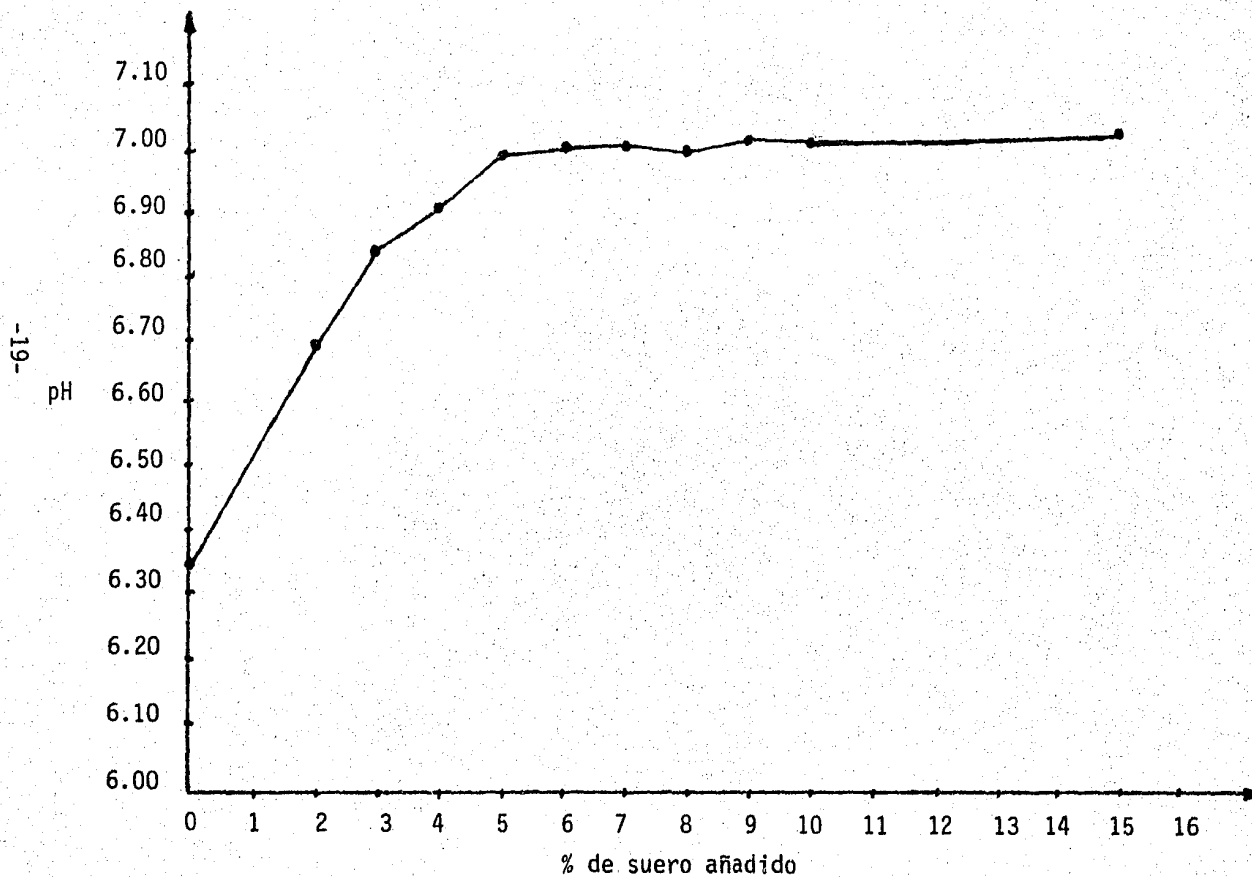
Sol. HT / % de suero	pH
0	6.35
1	6.40
2	6.70
3	6.82
4	6.90
5	7.00
6	7.01
7	7.02
8	7.04
9	7.05
10	7.08
15	7.10

Cuadro No. 2

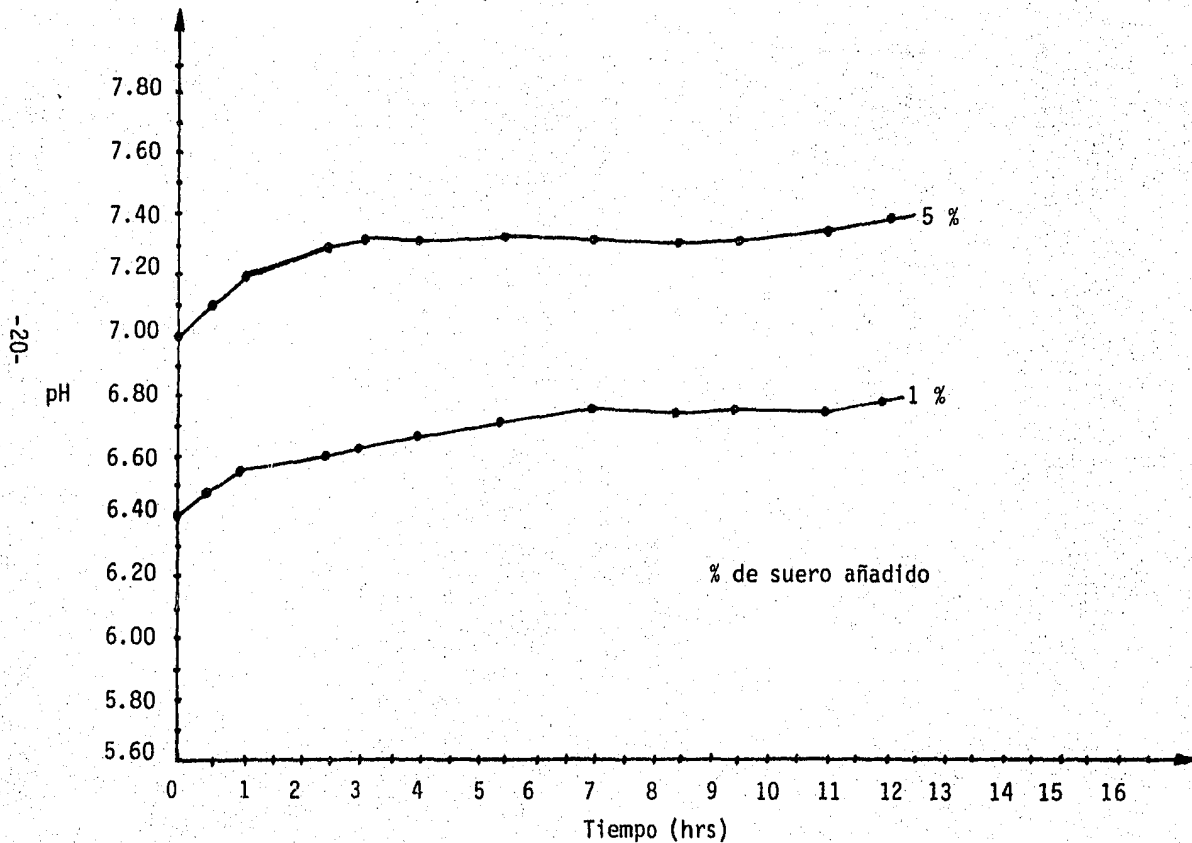
pH de las soluciones HT y PBS suplementadas con diferentes concen-
traciones de suero de rata

Tiempo	Sol. HT / % RS		Sol. PBS / % RS		
	1 %	5 %	1 %	10 %	20 %
0.00	6.40	6.99	7.00	7.12	7.20
0.30	6.52	7.19	7.11	7.29	7.36
1.00	6.54	7.20	7.12	7.30	7.39
2.30	6.60	7.30	7.19	7.35	7.45
3.00	6.62	7.31	7.09	7.38	7.49
4.00	6.63	7.33	7.07	7.40	7.42
5.30	6.70	7.35	7.02	7.28	7.45
7.00	6.75	7.36	7.00	7.29	7.49
8.30	6.76	7.37	7.04	7.32	7.50
9.30	6.78	7.40	7.06	7.37	7.53
11.00	6.80	7.45	7.10	7.40	7.60
12.00	6.84	7.48	7.13	7.42	7.65

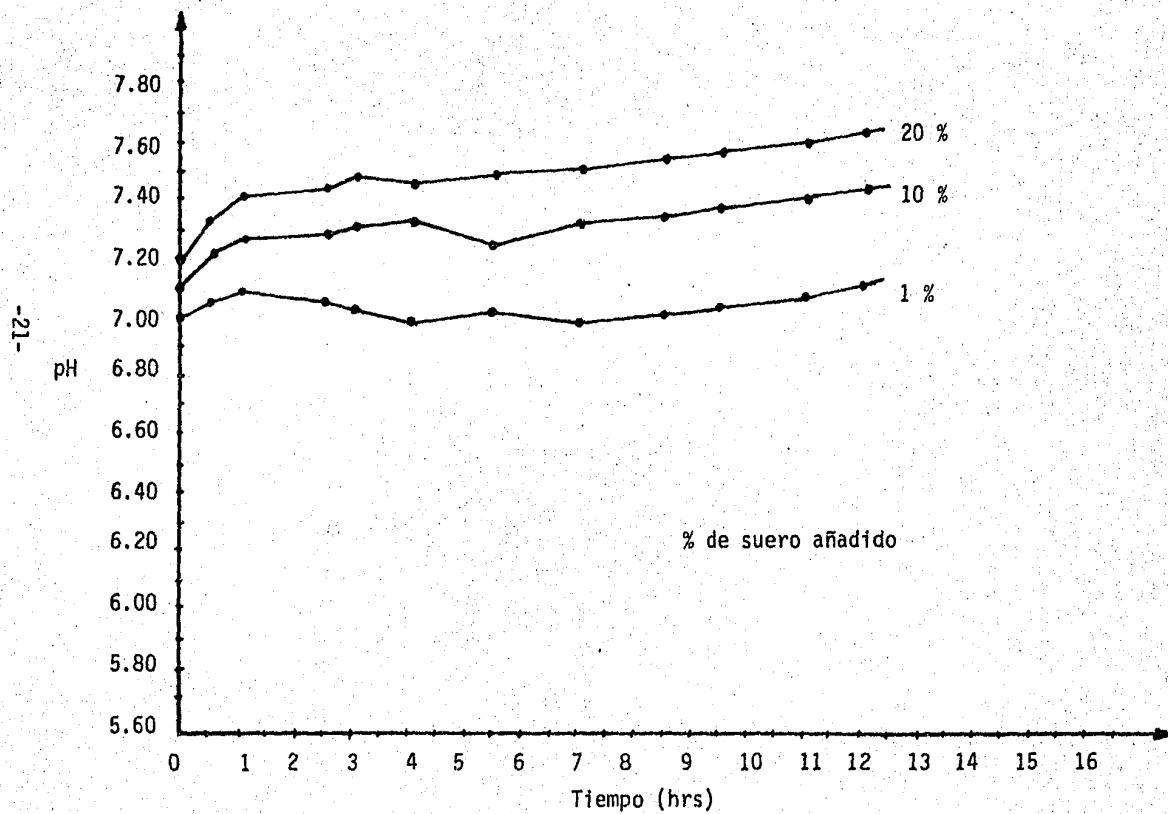
Gráfica 1 : Variaciones de pH de la solución HT en función del % de suero añadido



Gráfica 2 : Variaciones del pH de la solución HT en función del tiempo



Gráfica 3 : Variaciones del pH de la solución PBS en función del tiempo



3.- Estudio Fotográfico

En las láminas 3 a 6, se presenta un estudio fotográfico de la morfología de los embriones que permanecieron a temperatura ambiente tanto en solución HT como en la solución PBS suplementadas con diferentes orígenes séricos.

De todos los estudios morfológicos desarrollados a lo largo del presente trabajo, no se observaron diferencias significativas a nivel morfológico en los embriones que permanecieron tanto en la solución HT como en la solución PBS; lo cual, se puede corroborar a lo largo de las secuencias fotográficas presentadas. Lo anterior era de esperarse, hasta cierto punto, por las siguientes razones:

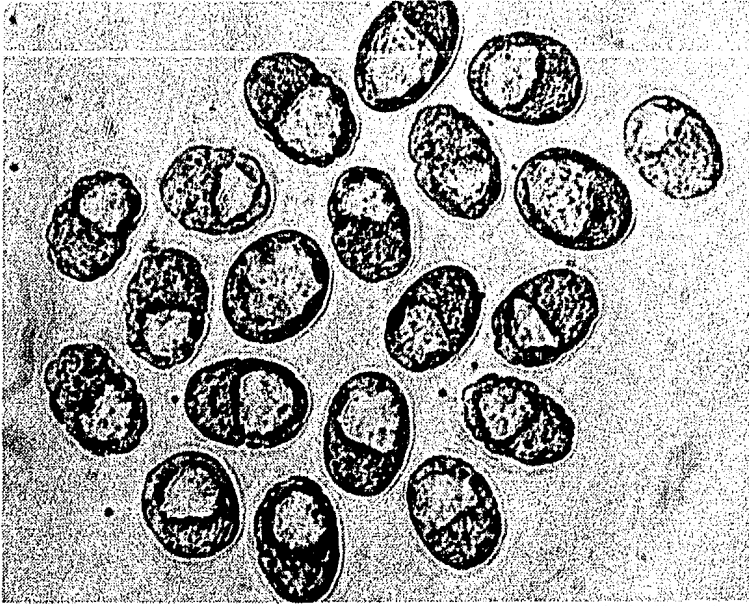
- a.- Tanto la solución HT como PBS poseen una composición iónica semejante, lo cual favorece como se vio en la introducción a los procesos metabólicos, enzimáticos, y de compactación de los embriones.
- b.- La concentración ósmótica tanto de la solución HT como PBS se encuentran dentro del rango fisiológico de los 270 a 310 miliósmoles.
- c.- Tanto la solución HT como PBS poseen una fuente energética la cual es utilizada para el metabolismo y crecimiento embrionario, teniendo la solución HT lactato de sodio y la solución PBS piruvato de sodio y glucosa.
- d.- Tanto la solución HT como PBS cuando son suplementadas con concentraciones adecuadas de suero, permiten no solamente la estancia de los embriones fuera del ambiente materno, sino, que además impiden que estos se adhieran a la superficie de los recipientes y se precipiten.

e.- La solución HT no posee un sistema intrínseco de amortiguación del pH como lo tiene la solución PBS, sin embargo, - cuando se suplementa ésta (HT) con 5 % de suero, adquiere un nuevo valor de pH fisiológico, el cual se mantiene dentro de pequeñas variaciones por ocho horas. (Ver cuadro número 2)

Por otra parte, cabe mencionar que de los embriones utilizados fueron tomados algunos y se transplantaron quirúrgicamente a ratas sincronizadas estralmente con las donadoras, las que se sacrificaron a los quince días y estaban gestando fetos - aparentemente normales; denotando ésto, que no existen diferencias significativas en el número de fetos en desarrollo obtenidos cuando en la colecta, cultivo y transferencia, se utilizó ya sea PBS o HT.

HT/RS (5%)

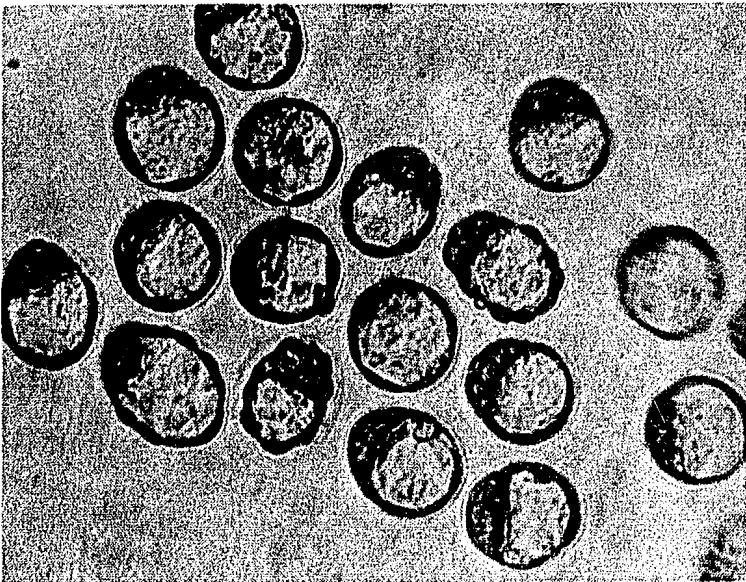
LAMINA 1



0 hrs. 22°C.



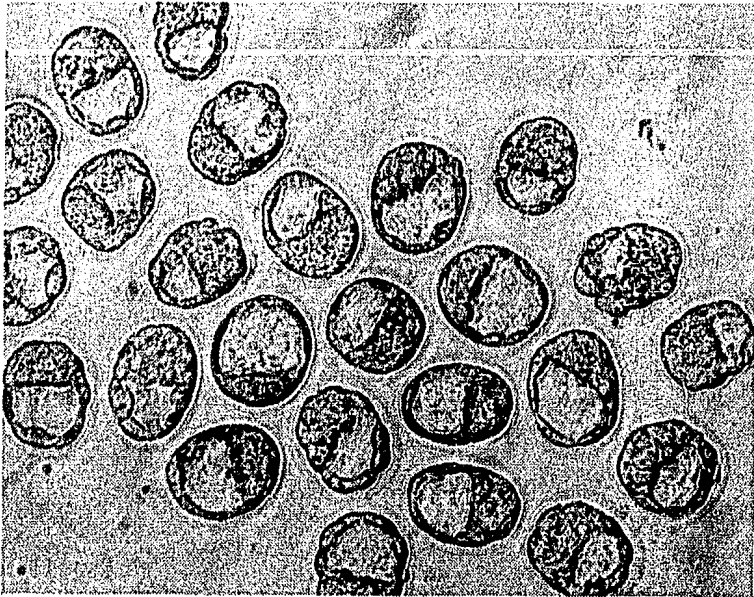
HT/RS (5%)



9 hrs. 22°C.

PBS/RS (20%)

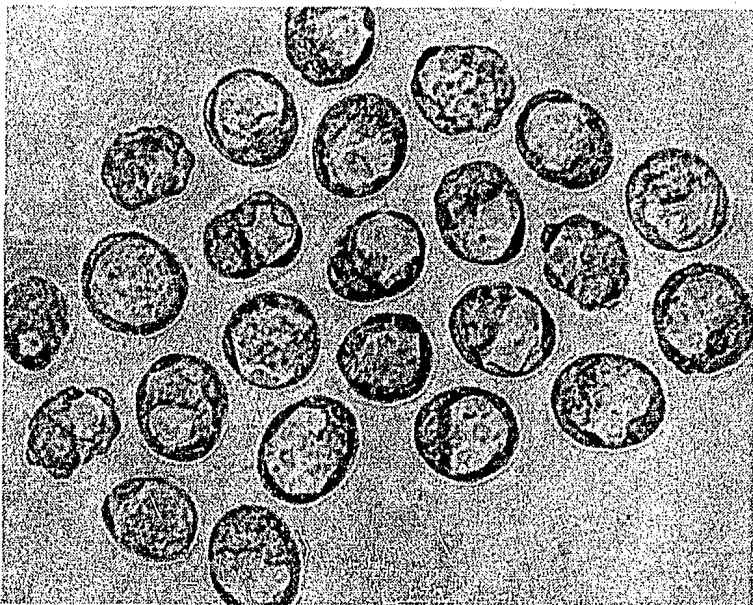
LAMINA 2



0 hrs. 22°C

PBS/RS (20%)

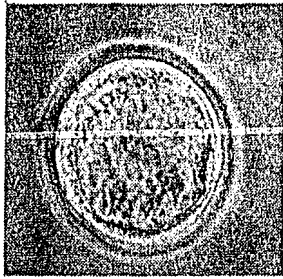
100 μ m



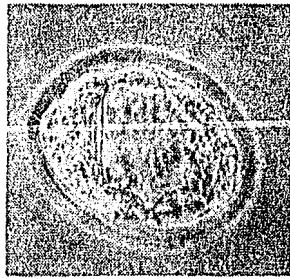
9 hrs. 22°C

HT/RS (5%)

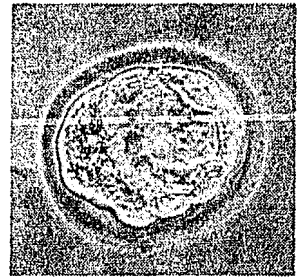
LAMINA 3



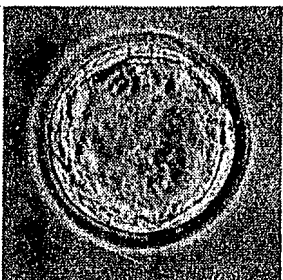
A



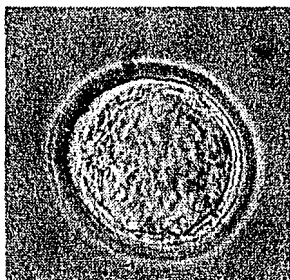
B



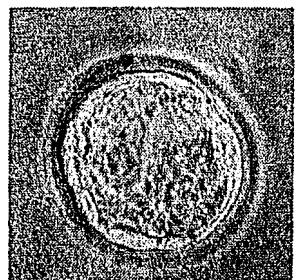
C



A'



B'

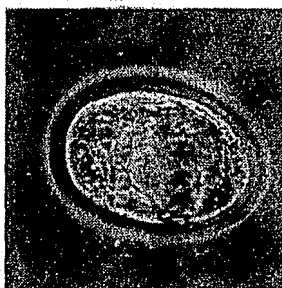


C'

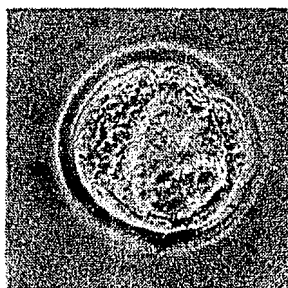
A,B,C - 0hrs, 22 °C
A',B',C' - 9hrs, 22 °C

PBS/RS (10%)

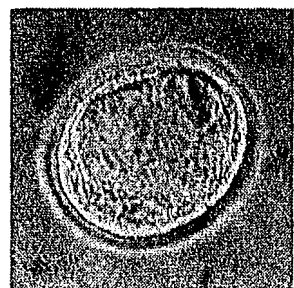
LAMINA 4



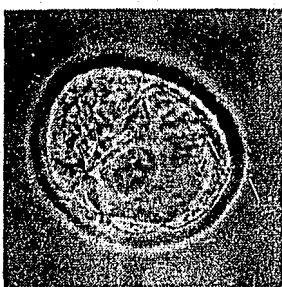
A



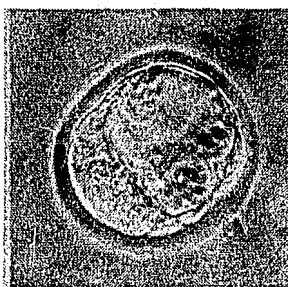
B



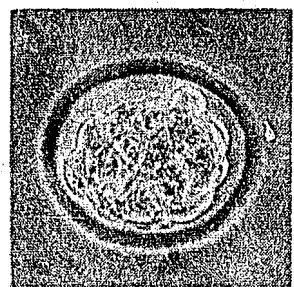
C



A'



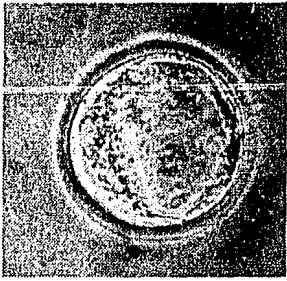
B'



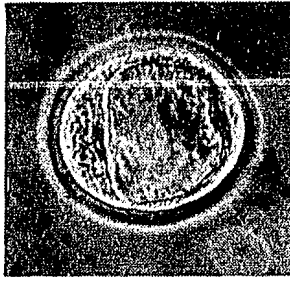
50 μm

PBS/FCS (10%)

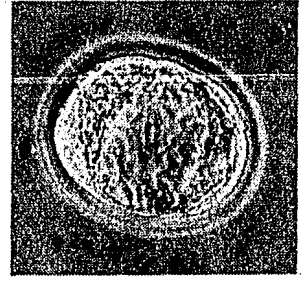
LAMINA 5



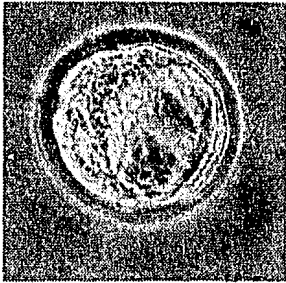
A



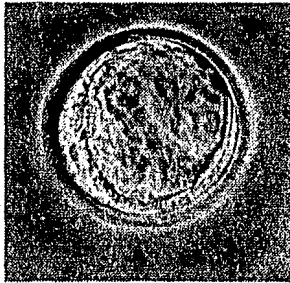
B



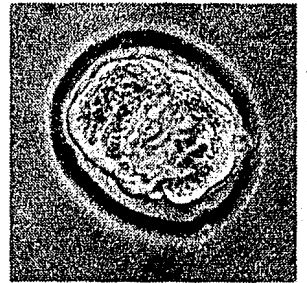
C



A'



B'

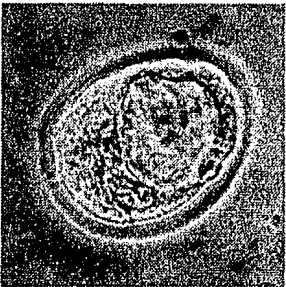


C'

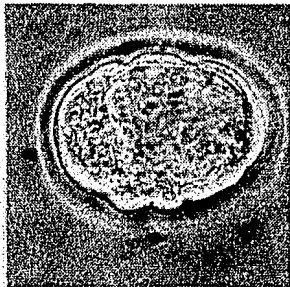
A,B,C - 0 hrs. 22 °C
A',B',C' - 9 hrs. 22 °C

PBS/BSA (0.4%)

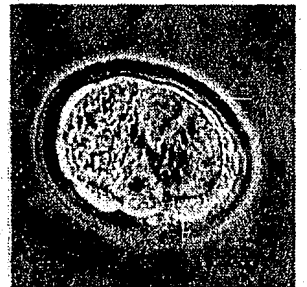
LAMINA 6



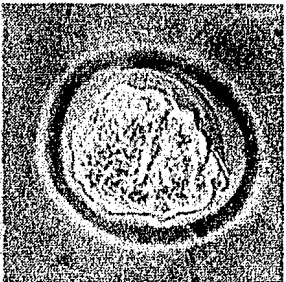
A



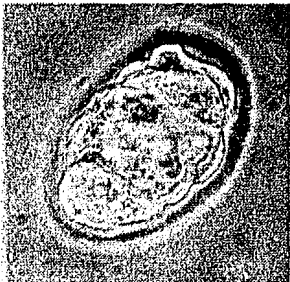
B



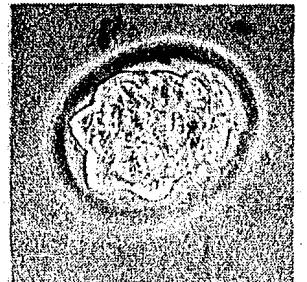
C



A'



B'



C'

50 μm

VII.- CONCLUSIONES

- 1.- La solución HT puede ser utilizada como un medio alternativo de colecta de embriones de rata, siempre y cuando se encuentre convenientemente suplementada.
- 2.- No se han observado diferencias morfológicas significativas en los embriones colectados tanto con solución HT como con solución PBS.
- 3.- El suplemento sérico del 5 % es adecuado desde el punto de vista físico y biológico para el empleo de la solución HT - como medio de colecta.
- 4.- Es probable que con los resultados del presente trabajo, así como otros que actualmente se vienen desarrollando; se dé como respuesta la disminución de los costos en los medios de colecta para embriones de animales domésticos.

Se puede utilizar como medio de recolección embrionaria la solución HT suplementada y pasar los embriones a la solución PBS si es que requerimos que la permanencia de estos fuera del ambiente materno se prolongue. Es importante señalar que existen comercialmente en el mercado nacional soluciones Hartmann con dextrosa o glucosa al 5 y 2.5 %, que están más completas como medios de recolección embrionaria.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allen, R. L., Blondioli, K. R. and Wright, W. R., 1982. The ability of fetal calf serum, new born calf serum- and normal steer serum to promote the in vitro development of bovine morulae. *Therio.*, 18:185-189
- 2.- Betteridge, K. J., Eaglesome, M. D., Randall, C. B. and Mitchell, D., 1980. Collection description and - transfer of embryos from cattle 10 - 16 days after oestrus. *J. Reprod. Fertil.*, 59:205-216
- 3.- Brinster, R. L., 1963. A method for in vitro cultivation of mouse ova from two cell to blastocyst. *Expl. Cell Res.*, 32:205-208
- 4.- Brinster, R. L., 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J. Exp. Zool.*, 158: - 49-58
- 5.- Brinster, R. L., 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source *J. Exp. Zool.*, 158:59-68
- 6.- Brinster, R. L., 1971. Uptake and incorporation of amino - acids by the preimplantation mouse embryo. *J. Reprod. Fet.*, 27:329-338

- 7.- Church, R. B. and Shea, B. F., 1977. The role of embryo - transfer in cattle improvement programs. Can. J.- Anim. Sci., 57:33-45
- 8.- Dizzio, S. N. and Fosca, R. J., 1977. Sodium dependent amino acid transport in preimplantation mouse embryos. - Devl. Biol., 59:198-205
- 9.- Dubelcco , R., 1954. Behavior and preparation of the solu - tion whit phosphate. J. Exp. Med., 99:167
- 10.- Eaglesome, M., Hare, W. and Singh, E., 1980. Embryo trans - fer; A discussion on its potencial for infections disease control based on a review of studies on - infection of gametes and early embryos by various agents. Can. Vet. J., 21:106-112
- 11.- Epstein, C. I., 1975. Gene expression and macromolecular - synthesis during preimplantation development. Bi- ol. Reprod., 12:82-105
- 12.- Farrand, G. D., 1981. Identification, clasification and - handling of embryos. Proc. short course in embryo transfer in beef cattle, Colorado State Univ., Ft. Collins.
- 13.- Fridhandler, L., 1968. Biology of gestation, vol. 1, 1th.- ed. N. S. Asalli, Academic Press, New York.
- 14.- Hafez, E. S. E., 1965. Structural and development anomalies of rabbit ova. Internat. J. Fertil., 6:394-407

- 15.- Kolb, E., 1974. Fisiología Veterinaria, vol. 2, segunda - edición, capt. 16, edit. Acribia, Saragoza España.
- 16.- Lehninger, A. L., 1979. Bfoquímica, segunda edición, capt. 3, 4, 17, 25, 23, y 28, edit. Omega, Barcelona Es paña.
- 17.- Litter, M., 1978. Compendio de Farmacología, segunda edición, capt. 7, edit. El Ateneo, Buenos Aires Argentina.
- 18.- Newcomb, R., Christie, W., and Rowson, L. E., 1980. Non - sur_ gical transfer of bovine eggs: Investigation of some factors affecting embryo survival. Vet. Record, 106: 190-193.
- 19.- Paul, J., 1959. Cell and tissue culture, pag. 1 - 85, edit. - E & S. Livingstone LTD, London.
- 20.- Putman, F. W., 1977. Successful culture in vitro of swine em bryos to the blastocyst stage. J. Anim. Sci., 44:854 858 .
- 21.- Quinn, P., 1982. Fertilization and culture of embryos; fac- tors which have a major influence on embryo survi- val in vitro. Embryol. Exp. Morph. 46:47-50
- 22.- Renard, J. P., Philippon, A. and Menezo, Y., 1980. In vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. J. Reprod. Fert., 58:161-164

- 23.- Rizzino, A. and Sherman, M. I., 1979. Development and differentiation of mouse blastocysts in serum free medium. *Expl. Cell Res.*, 121:221-233
- 24.- Rowson, I. E. A., Moor, R. M. and Lawson, R. A. S., 1969.- Fertility following egg transfer in the cow: Effect of method, medium and synchronization of oestrus. *J. Reprod. Fert.*, 18:517-523
- 25.- Schneider, U. and Hahn, J., 1979. Bovine embryo transfer in Germany. *Therio.*, 11:63-80
- 26.- Seidel, G. E., Seidel, S. M. and Bowen, R. A., 1980. Bovine embryo transfer procedures, Colorado State Univ. Expt. Stat and Anim. Reprod. Lab. General, series-975.
- 27.- Seidel, G. E., 1981. Critical review of embryo transfer procedures with cattle; Fertilization and embryonic development in vitro. L. Mastronianni and J. D. Bridgers, edit. Plenum, New York.
- 28.- Shea, B. F., Latour, J. P. A., Beridian, K. N. and Baker, R. D., 1976. Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43:809-815
- 29.- Shea, B. F., 1981. Evaluating the bovine embryo. *Therio.*, 15:31-42

- 30.- Sherman, M. I. and Scllens, M. H., 1980. Effects of culture conditions on the developmental programme of mouse blastocysts. J. Embryol. Expl. Morph., 56:1-22
- 31.- Sellens, M., Stein, S. and Sherman, M. I., 1981. Protein and free amino acid content in preimplantation mouse - embryos and in blastocysts under various culture - conditions. J. Reprod. Fert., 61:307-315
- 32.- Sorensen, A. M., 1982. Reprodución Animal, primera edición, capt. 13, edit. McGraw-Hill, D.F. México.
- 33.- Tervit, H. R., Whittingham, D. G. and Rowson, E. A., 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fert., 30:493-497
- 34.- Vिलlee, C. A., 1979. Biología, séptima edición, capt. 10, - edit. Interamericana, D. F. México.
- 35.- Voelkel, S. A., Arntson-Morgan, K. C. and Godke, R. A., 1981 Heat inactivation of lame newborn calf and steer - serafor potential use in embryo transplant procedu- res. Therio., 15:125-128
- 36.- Whitten, W. K., 1956. Culture of tubal mouse ova. Nature, - Lond., 177:96-99
- 37.- Wright, R. W., Anderson, G. B., Cupps, P. T. and Drost, M., 1976. Successful culture in vitro of bovine embryos to the blastocyst stage. Biol. of Reprod. 14:157-162

- 38.- Wright, R. W., Anderson, G. B., Cupps, P. T. and Drost, M. 1976. Blastocyst expansions and hatching of bovine ova cultured in vitro. J. Anim. Sci., 43:170-174
- 39.- Wright, R. W., 1977. Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage. J. Anim. Sci., -44:854-858