

## Efecto del peso de la donadora sobre la tasa de colecta de embriones murinos (*Mus musculus*)

Pedro Cabrera<sup>1\*</sup>, Adriana Fernandez<sup>1</sup>, Pedro Bastidas<sup>1</sup>, Edison Perozo<sup>1</sup>, Magaly Molina<sup>2</sup>, Angélica Bethencourt<sup>3</sup>, Isis Vivas<sup>4</sup>, Yuraima Reyes<sup>5</sup> y Thais Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Central de Venezuela (UCV), Apartado 4563, Maracay 2101A, Aragua, Venezuela. \*Correo electrónico: pedro.cabrera@ucv.ve

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Sanidad Animal, Maracay, Aragua, Venezuela. <sup>3</sup> Cátedra de Parasitología, FCV, UCV. Maracay, Aragua. Venezuela.

<sup>4</sup>Cátedra de Estadística, FCV, UCV. Maracay, Aragua. Venezuela.

<sup>5</sup>Bioterio, FCV, UCV. Maracay, Aragua. Venezuela.

---

### RESUMEN

La producción *in vivo* de embriones en la especie murina constituye una práctica biotecnológica influenciada ampliamente por una serie de variables, como dosis y tipo de hormonas superovulatorias utilizadas, la cepa y aspectos nutricionales de la donadora, entre otras. Estos factores pueden afectar en gran medida la eficiencia del sistema. Conocer y controlar la mayor cantidad de estas y otras variables permitirá obtener un número elevado de embriones de excelente calidad en corto tiempo y a muy bajo costo. Con la finalidad de evaluar la influencia del peso de la donadora al inicio del protocolo de superovulación sobre la tasa de colecta de embriones se utilizaron 54 ratones hembra agrupados de acuerdo a su peso en cinco categorías: 12,2 - 14,9; 15,0 - 17,6; 17,7 - 20,3; 20,4 - 23,0 y 23,1 - 25,8 g. Un total de 940 embriones fueron colectados, en los cuales se demostró el efecto ( $P < 0,05$ ) del peso de la donadora sobre el número de embriones colectados. Aquellas hembras con un rango de peso de 17,7 a 20,3 g presentaron mayor tasa de colecta de embriones de excelente calidad y congelables, con 10,4 y 6,0 mórulas y blastocitos/donadora, respectivamente. Estos resultados indican la importancia de considerar el peso de la hembra murina donadora antes de la aplicación del protocolo hormonal superovulatorio en un sistema de producción *in vivo* de embriones.

*Palabras clave:* embrión, murino, peso

---

### Effect of donor weight on recovery rate of murine embryos (*Mus musculus*)

#### ABSTRACT

*In vivo* production of murine embryos is a biotechnology practice widely influenced by a series of variables such as dose and type of hormone for superovulation, strain and level of nutrition of the donor, among others. These factors can affect the efficiency of the system. Therefore, knowing and controlling most of these factors would allow obtaining a higher number of excellent quality embryos at a very low cost in a shorter period of time. With the aim to evaluate the effect of the donor weight at the beginning of the superovulation protocol on the recovery rate, 54 female mice were divided according to their weight in five categories: 12.2 - 14.9, 15.0 - 17.6, 17.7 - 20.3, 20.4 - 23.0, and 23.1 - 25.8 g. A total of 940 embryos were collected, which showed a weight effect ( $P < 0.05$ ) of the donor on the number of embryos recovered. Female mice with weight between 17.7 to 20.3 g had the highest recovery rate, with 10.4 and 6.0 morulae and blastocysts/donor, respectively. These results indicate the importance of considering the weight of the murine donor female before hormonal superovulation protocol in an *in vivo* production system of embryos.

*Keywords:* embryo, murine, weight

## INTRODUCCIÓN

Biotechnologías reproductivas como la producción y la criopreservación de embriones se encuentran en constante desarrollo (Roberts, 2001). Gran cantidad de investigaciones básicas y aplicadas sobre estos procedimientos biotecnológicos son realizadas con embriones de ratón *Mus musculus*, representando un invaluable modelo animal experimental (Rall, 1992; Mazur *et al.*, 2008; Taft, 2008).

Los embriones murinos juegan un rol importante en el desarrollo de nuevas técnicas de reproducción asistida, ya que al demostrar que estas técnicas son seguras y efectivas en el ratón pueden ser adaptadas a embriones de otras especies domésticas de interés económico como el bovino. Debido a que los costos de mantenimiento de los animales de laboratorio y de los tratamientos hormonales son considerablemente inferiores y el abastecimiento de los embriones es significativamente superior se constituye en una valiosa herramienta (Prather y First, 1988; Romero, 2001; Taft, 2008).

El número y la calidad de los embriones colectados de una donadora murina está influenciado por una gran cantidad de variables (Robinson *et al.*, 2003). Entre ellas destaca el protocolo de superovulación, en el cual se utilizan hormonas exógenas que sobrestimulan los ovarios de la hembra donadora para producir un elevado número de ovulaciones y conseguir un mayor número de embriones en un solo ciclo estral (De la Fuente, 2001). La implementación de este manejo hormonal resulta beneficiosa, tomando en cuenta que la viabilidad de los embriones colectados en hembras superovuladas no difiere de los provenientes de hembras sin tratamiento hormonal (Kovacs *et al.*, 1993). En tal sentido, Cornejo Cortés *et al.* (2006) determinaron la influencia de la dosis hormonal superovulatoria sobre la tasa de embriones colectados. Además, el tipo de hormona superovulatoria administrada (FSH o eCG) influyó la obtención de diferentes tasas de embriones colectados por donadora (Muñoz *et al.*, 1994).

Otra variable que influye sobre la tasa de colecta de ovocitos y embriones murinos corresponde a la cepa de la donadora, habiéndose reportado mayor número de embriones por donadora en cepas no consanguíneas que en cepas consanguíneas (Corbin y McCabe, 2002). Asimismo, Byers *et al.* (2006) reportaron amplias diferencias al evaluar 10 cepas

murinas con grado de consanguinidad similar, observando una baja tasa de colecta de ovocitos en donadoras de la cepa A/J, siendo marcadamente mayor para la cepa 129SI/SvImJ (4,0 vs. 39,5 ovocitos normales por hembra, respectivamente).

También los aspectos nutricionales pueden afectar a las donadoras, influyendo negativamente sobre la producción *in vivo* de embriones. En este sentido se ha reportado que la exposición de las donadoras a bajas dosis de aflatoxina B1 (3,6 ppb) en el alimento concentrado causa una marcada disminución en la calidad de los embriones murinos, observándose el citoplasma degenerado en la totalidad de los embriones colectados, sin verse afectada la tasa de colecta por donadora (Cabrera *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que en un sistema de producción *in vivo* de embriones murinos existe gran cantidad de variables estudiadas y otras más no estudiadas que influyen sobre la eficiencia en la producción de grandes cantidades de embriones de excelente calidad, el objetivo del presente trabajo es determinar la influencia del peso de la donadora al inicio del protocolo de superovulación sobre el número de embriones murinos colectados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se escogieron 80 ratones hembras vírgenes de la cepa NIH (National Institute of Health), con un rango de edad entre seis a ocho semanas, agrupando 16 animales experimentales por cada una de las cinco categorías de acuerdo a su peso al inicio del protocolo de superovulación: categoría uno, con un rango de peso entre 12,2 y 14,9 g; categoría dos, 15,0 a 17,6 g; categoría tres, 17,7 a 20,3 g; categoría cuatro, 20,4 a 23,0 g y la categoría cinco, entre 23,1 y 25,8 g. Además, fueron utilizados 8 ratones machos de la misma cepa, con una edad promedio de ocho semanas, a los cuales se les comprobó su fertilidad, mediante exposición previa a hembras y nacimiento de crías viables. Se mantuvieron todos los animales en un ambiente donde se controló tanto la temperatura (promedio 24°C), como el período de iluminación, manteniendo la luminosidad entre 06:00 y 18:00 h, es decir, un período de 12 h luz y 12 h oscuridad, durante un tiempo mínimo de 10 d previo al inicio del protocolo de superovulación.

Al azar, indistintamente del peso, fueron seleccionados grupos de ocho ratones hembras para

cada jornada de colecta, los cuales simultáneamente se trataron aplicando el protocolo de superovulación descrito por Kuleshova *et al.* (2001). Se denominó día cero al inicio del tratamiento hormonal, indistintamente de la fase del ciclo estral de la donadora, ya que no existe diferencia significativa en cuanto al número de embriones colectados en las diferentes fases del ciclo estral (Muñoz *et al.*, 1992). El protocolo superovulatorio se inició con la administración de una dosis de 10 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Folligon<sup>®</sup>, Intervet), por vía intraperitoneal entre las 14:00 y 16:00 h. Cuarenta y ocho horas después se aplicó una dosis de 10 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Pregnyl<sup>®</sup>, Organon), por vía intraperitoneal, colocando las hembras inmediatamente en contacto con machos enteros en relación 1:1. Dieciocho horas después se visualizó la presencia del tapón vaginal como indicador positivo de monta, siendo sólo estas hembras las que fueron posteriormente colectadas el día seis entre las 08:00 y 10:00 h.

Previo a la colecta, considerando las normas de ética en animales de experimentación, se sacrificaron las donadoras por dislocación cervical. Acto seguido, a través de un abordaje abdominal, se disecaron ambos cuernos uterinos bajo lupa estereoscópica (Carl Zeiss, 40 X) colocados en una placa de Petri desechable (Falcon Integrid<sup>®</sup>; 100 x 100 mm). Cada cuerno fue separado de su respectivo ovario y oviducto, y lavado internamente con una cánula plástica (dispuesta en dirección cérvix-oviducto), adaptada a una jeringa contentiva de solución base (SB: 4 mg de albúmina sérica bovina por mL de fosfato buferado salino). Para el lavado a presión de cada cuerno se utilizó aproximadamente 1 mL de esta solución.

Las placas conteniendo la solución de lavado, se examinaron bajo un microscopio invertido (Carl Zeiss, 150 X). Los embriones identificados se transfirieron a otra placa similar, conteniendo gotas de aproximadamente 100  $\mu$ L de SB.

Todos los embriones localizados fueron sometidos a un proceso de evaluación y selección, tomando en cuenta los parámetros establecidos por Lindner y Wright (1983) en bovinos, determinando el grado de calidad como patrón para realizar su clasificación. Para efectos de este trabajo experimental, la población en estudio estuvo compuesta solamente por embriones grado uno o de excelente calidad, los cuales son embriones simétricos, esféricos, con células de

tamaño, color y textura uniforme (Lindner y Wright, 1983).

Este conjunto de embriones grado uno se clasificaron en dos sub grupos, no congelables y congelables. Los embriones no congelables son aquellos embriones en los cuales el estadio de desarrollo no se corresponde con el estadio esperado al momento de la colecta, tomando en cuenta las horas transcurridas después de la fertilización. Los embriones congelables son aquellos en los que concuerda su estadio de desarrollo con el esperado el día de la colecta (Butler y Biggers, 1989).

Los datos obtenidos fueron analizados tanto por estadística descriptiva como por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis haciendo uso del Sistema de Análisis Estadístico (SAS, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación del protocolo hormonal de superovulación permitió una tasa de monta positiva total (visualización del tapón vaginal) de 67,5% (54/80), observándose 62,5; 100; 93,7; 43,7 y 37,5% de monta positiva para los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Durante la ejecución del experimento se llevaron a cabo 54 colectas a donadoras de las 5 categorías de peso, obteniéndose 940 embriones de excelente calidad en distintos estadios de desarrollo, determinando que no hubo efecto ( $P > 0,05$ ) del peso de la donadora sobre el promedio de embriones colectados en los estadios iniciales de desarrollo (embriones de 2 a 16 células). Sin embargo, se observó un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) del peso de la donadora sobre el promedio de embriones colectados en estadios de desarrollo más avanzados, mórula y blastocito (Cuadro 1). Es importante destacar que la mayor cantidad de embriones colectados presentaron un estadio de desarrollo de mórula y en este sentido las donadoras de la categoría tres (17,7 a 20,3 g) produjeron el mayor promedio por colecta de embriones de un mismo estadio de desarrollo, en este caso mórulas ( $10,4 \pm 2,8$ ).

Al analizar los datos presentados en el Cuadro 2 no se evidenció diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) en el promedio total de embriones colectados, así como tampoco en el promedio de embriones congelables y no congelables colectados entre los grupos de donadoras, clasificadas por su peso al inicio del protocolo de superovulación. Es importante resaltar,

Cuadro 1. Número de embriones por colecta (promedio  $\pm$  error estándar) en distintos estadios de desarrollo obtenidos en 54 colectas y clasificados de acuerdo al peso de la donadora.

Peso	2 y 4 células	8 y 16 células	Mórulas	Blastocitos
g	Número			
12,2 a 14,9	2,6 $\pm$ 0,7a†	4,2 $\pm$ 1,5a	9,2 $\pm$ 0,8a	1,4 $\pm$ 0,5a
15,0 a 17,6	1,6 $\pm$ 0,6a	1,5 $\pm$ 0,5a	3,9 $\pm$ 0,7b	6,9 $\pm$ 1,3b
17,7 a 20,3	1,2 $\pm$ 0,5a	3,6 $\pm$ 0,9a	10,4 $\pm$ 2,8ab	6,0 $\pm$ 1,1b
20,4 a 23,0	0,5 $\pm$ 0,4a	2,0 $\pm$ 0,9a	8,7 $\pm$ 1,6ab	6,5 $\pm$ 1,4b
23,1 a 25,8	3,3 $\pm$ 1,4a	1,8 $\pm$ 0,6a	7,6 $\pm$ 2,1ab	3,1 $\pm$ 0,8ab

† Valores con diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Cuadro 2. Número (n) y promedio por colecta ( $\pm$  error estándar) de embriones no congelables (ENC), embriones congelables (EC) y totales obtenidos en 54 colectas y clasificados de acuerdo al peso de la donadora.

Peso	ENC		EC		Total	
	n	Promedio	n	Promedio	n	Promedio
12,2 a 14,9	68	6,8 $\pm$ 1,3	106	10,6 $\pm$ 0,7	174	17,4 $\pm$ 1,3
15,0 a 17,6	51	3,1 $\pm$ 1,0	174	10,8 $\pm$ 1,4	225	14,0 $\pm$ 2,0
17,7 a 20,3	73	4,8 $\pm$ 1,0	247	16,4 $\pm$ 2,5	320	21,3 $\pm$ 2,8
20,4 a 23,0	18	2,5 $\pm$ 0,8	107	15,2 $\pm$ 2,2	125	17,8 $\pm$ 2,9
23,1 a 25,8	31	5,1 $\pm$ 1,9	65	10,8 $\pm$ 2,6	96	16,0 $\pm$ 3,9
Total	241		699		940	

que la categoría tres, comprendida entre los pesos 17,7 a 20,3 g, fue la que presentó el mayor promedio de embriones totales colectados por donadora (21,3), presentando además, el mayor promedio de embriones congelables por colecta (16,4).

Considerando la proporción de estructuras congelables vs. estructuras no congelables por categorías de peso de las donadoras, se evidenció que las dos categorías extremas (categorías uno y cinco) no superaron la relación 2:1, mientras que las tres categorías intermedias presentaron una relación superior a 3:1. La categoría tres presentó 3,3 estructuras congelables por cada estructura no congelable y la categoría cuatro presentó la mayor relación entre dichas estructuras en el experimento (5,9:1).

Estos resultados se correlacionan con lo reportado por Robker (2008), quien reseña que hembras murinas obesas proporcionaron ovocitos de mala calidad, y por consiguiente reducida tasa de sobrevivencia

de blastocitos y anormal diferenciación celular del embrión, resaltando el efecto del peso sobre la producción de embriones *in vivo*.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que es necesario tomar en cuenta el peso de la hembra donadora murina antes de iniciar el protocolo hormonal superovulatorio para la producción de embriones *in vivo*, ya que el peso corporal influye sobre la cantidad y calidad de los embriones preimplantacionales colectados. Utilizando hembras de aproximadamente 17 a 20 g se obtuvieron mayor número de embriones por hembra colectada de una manera sencilla, abundante, económica y repetible.

## LITERATURA CITADA

Butler J. y J. Biggers. 1989. Assessing the viability of preimplantation embryo *in vitro*. *Theriogenology*, 31: 115-126.

- Byers S.L., S.J. Payson y R.A. Taft. 2006. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology*, 65: 1716-1726.
- Cabrera P., A. Fernández, T. Díaz, P. Bastidas, M. Molina, A. Bethencourt, I. Vivas, Y. Reyes y F. Sifontes. 2006. Efecto teratógeno de la aflatoxina B1 sobre embriones murinos. *Agronomía Trop.*, 56: 485-488.
- Corbin T.J y J.G. McCabe. 2002. Strain variation of immature female rats in response to various superovulatory hormone preparations and routes of administration. *Contem. Top. Lab. Anim. Sci.*, 41: 18-23.
- Cornejo Cortés M.A., C. Sánchez Torres, J.C. Vázquez Chagoyán, H.M. Suárez Gómez, G. Garrido Fariña y M.A. Meraz Ríos. 2006. Rat embryo quality and production efficiency are dependent on gonadotrophin dose in superovulatory treatments. *Lab. Anim.*, 40: 87-95.
- De la Fuente J. 2001. Transferencia de embriones en el ganado bovino. *En* González Stagnaro C. (Ed.) *Reproducción Bovina*. Fundación Giraraz, Maracaibo, Venezuela. pp. 373-388.
- Kovacs M., L. Lowe y M. Kuehn. 1993. Use of superovulated mice as embryo donors for ES cell injection chimeras. *Lab. Anim. Sci.*, 43: 91-93.
- Kuleshova L.L., J.M. Shaw y A.O. Trounson. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43: 21-31.
- Lindner G. y R. Wright Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416.
- Mazur P., S. Leibo y G. Seidel. 2008. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: Importance, impact, status, and future directions. *Biol. Repr.*, 78: 2-12.
- Muñoz I., A. Gutiérrez, C. Rodríguez y B. Pintado. 1992. Influencia del ciclo estral sobre la respuesta a tratamientos de superovulación en ratonas. *Rev. Exp. Anim.*, 3: 121-125.
- Muñoz I., C. Rodríguez, A. Gutiérrez, M.J. Blánquez y B. Pintado. 1994. Comparison of superovulatory response of mature outbred mice treated with FSH or PMSG and developmental potential of embryos produced. *Theriogenology*, 41: 907-914.
- Prather R.S. y N.L. First. 1988. A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species. *J. Anim. Sci.*, 66: 2626-2635.
- Rall W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Repr. Sci.*, 28: 237-245.
- Roberts R. 2001. The place of farm animal species in the new genomics world of reproductive biology. *Biol. Repr.*, 64: 409-417.
- Robinson V., D.B. Morton, D. Anderson, J.F.A. Carver, R.J. Francis, R. Hubrecht, E. Jenkins, K.E. Mathers, R. Raymons, I. Rosewell, J. Wallece y D.J. Wells. 2003. Females used to provide fertilized eggs and blastocysts. *Lab. Anim.*, 37: 20-23.
- Robker R. 2008. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology*, 15: 115-121.
- Romero A. 2001. Fases de un experimento y elección del modelo experimental. *En* Zuñiga J.M., J.A. Tur Marí, S.N. Milocco y R. Piñeiro (Eds.) *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, España. pp. 587-603.
- SAS. 1998. SAS/STAT User's Guide. Rel. 6.03. SAS Institute Inc. Cary, EUA.
- Taft R. 2008. Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system. *Theriogenology*, 69: 10-16.