

Efecto de la administración de diferentes dosis de gonadotrofina coriónica equina sobre la respuesta ovárica y el desarrollo *in vitro* de embriones de ratón

TERUEL, M. T.¹⁻²; CATALANO, R. C.²; CALLEJAS, S. S.²;
CABODEVILA, J. A.²; GOMEZ, S.¹

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de gonadotrofina coriónica equina (eCG) (5, 7,5 o 10 UI) sobre parámetros ováricos y desarrollo *in vitro* de embriones de hembras ratón Balb C. El peso y diámetro ovárico fueron superiores en animales tratados con 7,5 y 10 UI de eCG que en animales controles ($P < 0,05$). La dosis de 10 UI produjo más ovocitos que aquella de 5 UI ($30,8 \pm 12,4$ vs. $18,9 \pm 6,8$ respectivamente, $P < 0,05$). El número total de mórulas no difirió entre grupos. Los porcentajes de ovocitos y mórulas morfológicamente normales resultaron independientes de la dosis de eCG ($73,8 \pm 22,7$; $63,8 \pm 24,8$; $70,6 \pm 16,1$ y $53,3 \pm 36,0$; $80,7 \pm 16,0$; $69,2 \pm 25,5$ para 5, 7,5 o 10 UI de eCG respectivamente). La formación de blastocistos no fue modificada por la dosis de eCG. A las 96 horas de cultivo, el porcentaje de *hatching* del grupo 7,5 UI fue superior al del grupo estimulado con 10 UI de eCG ($82,22$ vs $64,39$, $P < 0,05$). Se concluye que la morfología de ovocitos y mórulas y la diferenciación *in vitro*, son independientes de la dosis de eCG, no obstante, el *hatching* resulta modificado por el nivel de eCG.

Palabras clave: (estimulación ovárica), (ovocito), (desarrollo embrionario), (ratón)

¹Área de Ciencias Morfológicas, ²Área de Reproducción. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. B7000GHG Tandil, Argentina.

E-mail: mteruel@vet.unicen.edu.ar

Recibido: octubre 2005 - Aceptado: junio 2006 - Versión on line: junio 2006

InVet. 2006, 8(1): 149-156
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

149

Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on ovary response and *in vitro* mouse embryo development

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of different doses of equine gonatotropin hormone (eCG) (5, 7.5 or 10 IU) on the ovary response and *in vitro* embryo development in Balb C mice. The ovary weight and diameter increased for 7.5 and 10 IU of eCG compared to control group ($P < 0.05$). The number of oocytes was higher in females stimulated with 10 IU compared with those of 5 IU of eCG (30.8 ± 12.4 and 18.9 ± 6.8 respectively, $P < 0.05$). The number of morulae was similar between groups. The percentage of oocytes and morulae with normal morphology was not modified for the eCG level (73.8 ± 22.7 ; 63.8 ± 24.8 ; 70.6 ± 16.1 and 53.3 ± 36.0 ; 80.7 ± 16.0 ; 69.2 ± 25.5 for 5, 7.5 or 10 IU of eCG respectively, $P > 0.05$). *In vitro*, the differentiation was not modified by the dose level. The *hatching* rate at 96 h was higher for embryos from 7.5 IU compared to 10 IU (82.22 vs 64.39, $P < 0.05$). We concluded that, the percentage of normal oocytes and morulae and the differentiation rate are not dependent of the dose of eCG, however, the *hatching in vitro* is dose eCG dependent.

Key words: (ovarian stimulation), (oocyte), (embryo development), (mouse)

INTRODUCCIÓN

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es muy utilizada en los protocolos de superovulación debido a su acción folículo-estimulante, tanto para incrementar la eficiencia reproductiva en animales de interés productivo^{1,8,11,13}, como para la realización de trabajos de investigación en los que se utilizan animales de laboratorio^{3,6,9,15,18}. La administración de gonadotropinas aumenta la concentración de hormonas esteroideas lo cual puede afectar la morfofisiología ovárica, la dinámica folicular y con ello la calidad de ovocitos y embriones^{7,10}. Una respuesta óptima en términos de tasa ovulatoria está estrechamente relacionada con la dosis de hormona utilizada; no obstante, si bien un ovario estimulado hormonalmente genera un elevado número de ovulaciones, no siempre se correlaciona con la calidad de los ovocitos y/o

embriones recuperados ni con el posterior desarrollo preimplantacional^{2,3,9,10,17,18}. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes dosis de eCG sobre variables morfométricas ováricas, tasa de recolección y calidad de ovocitos y mórulas y sobre el desarrollo preimplantacional *in vitro* de embriones de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembras y machos Balb C que fueron mantenidos bajo un régimen de 12 horas luz /12 horas oscuridad durante 7 días previo a su uso. Todos los animales recibieron alimento y agua *ad libitum*. Se administraron, por inyección intraperitoneal, 5 UI (grupo 5, n: 18), 7,5 UI (grupo 7,5; n: 15) ó 10 UI (grupo 10; n:16) de eCG (Novormon®, Laboratorios Syntex S.A. Argentina), y 48 horas

más tarde 5 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Profasi ®, Laboratorios Serono, México) a 49 hembras a fin de producir superovulación. Como controles se utilizaron hembras sin estimulación ovárica. Veinticinco (25) hembras que recibieron estimulación ovárica (10, 7 y 8 para las dosis de 5 UI, 7,5 UI y 10 UI respectivamente), fueron apareadas con machos de fertilidad probada en una relación 1:1, al momento de recibir la dosis de hCG. A la mañana siguiente, se realizó la detección del tapón vaginal y se asignó ese día como día 1 de preñez. El trabajo con los animales fue realizado de acuerdo al Acta de Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Resolución 087/02 del Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires)

Morfometría ovárica

Las hembras destinadas a la recolección de ovocitos (8 controles y 8 por cada dosis de eCG), fueron sacrificadas e inmediatamente se extrajeron sus ovarios para el análisis morfométrico. Los dos ovarios de cada hembra fueron medidos utilizando lupa estereoscópica (Olympus SZ-PT, Japón), provista de un ocular micrométrico. El diámetro promedio ovárico se obtuvo a partir de los diámetros ováricos mayor y menor y se expresó en mm. Finalizada la medición de los ovarios, los mismos fueron pesados en balanza analítica (Sartorius BP-221S) y los valores se expresaron en mg.

Recolección de ovocitos y embriones

Para realizar la recolección de ovocitos, 24 hembras que recibieron tratamiento hormonal, fueron sacrificadas por dislocación cervical a las 24 horas posteriores a la administración de hCG; para la recolección de ovocitos en hembras controles, se realizó colpocitología diaria a 8 animales que fueron sacrificados en

metaestro para lograr un estado fisiológico ovárico semejante al experimental en cuanto a horas posteriores al momento de la ovulación. En ambos casos, los ovocitos se recolectaron por lavado de oviductos. Para la recolección de mórulas, 25 hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical en el día 3 de preñez (72 horas posteriores a la administración de hCG) mediante el lavado de oviductos y úteros. La recolección de ovocitos y mórulas se realizó bajo lupa estereoscópica, con medio HAM F10 (Gibco BRL, Life Technologies NY, USA) suplementado con 0,4% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemical Co. St Louis, USA) utilizándose una jeringa de 1 cc provista de aguja 30G con punta roma.

Cultivo de embriones

Embriones preimplantacionales en el estadio de mórula (n: 330) fueron cultivados en cápsulas Falcon N° 3002 (60 x 15 mm) en grupos de 5 (cinco) en microgotas de 25ml de medio HAM F10 suplementado con 0,4% de BSA cubiertas por vaselina líquida. El cultivo se realizó en estufa gaseada (Forma Scientific) durante 96 horas, bajo atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire y a 37°C.

Variables evaluadas

Peso ovárico y diámetro promedio ovárico. Número promedio de ovocitos y mórulas obtenido por hembra y porcentaje de ovocitos y mórulas morfológicamente normales obtenido por hembra (considerándose ovocitos con morfología normal a aquellos con citoplasma homogéneo y células granulosas asociadas y mórulas morfológicamente normales a las que presentaron intacta la zona pelúcida, cierto grado de compactación y no presentaron defectos tales como asimetría, blastómeros desprendidos de la masa celular o con granulaciones citoplasmáticas).

A las 24 y 48 horas de cultivo, (96 y 120 horas posteriores a la administración de hCG respectivamente), se evaluó el porcentaje de diferenciación (relación entre el total de mórulas que alcanzó el estadio de blastocisto sobre el total de mórulas cultivadas). Para evaluar el porcentaje de *hatching* (relación entre el total de mórulas que protruyó a través de la zona pelúcida sobre el total de mórulas cultivadas), las mórulas fueron controladas luego de 48, 72, y 96 horas de cultivo (120, 144 y 168 horas posteriores a la administración de hCG, respectivamente).

Las variables continuas fueron analizadas por ANOVA; las discretas mediante Chi², estableciéndose un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

El peso ovárico (promedio \pm desvío estándar) y el diámetro ovárico (promedio \pm desvío estándar) fueron significativamente superiores en aquellos animales que recibieron estimulación ovárica comparado con el grupo control; a su vez, en los animales con estimulación, el peso ovárico fue superior para aquellos que recibieron 7,5 y 10 UI de eCG ($P<0,05$; Tabla 1). El diámetro ovárico fue semejante para las tres dosis de eCG utilizadas. Para ambas variables, no se registraron diferencias entre ovario derecho e izquierdo ($P>0,05$).

El total de ovocitos recolectados por hembra (promedio \pm desvío estándar) fue

significativamente superior en los animales estimulados con 7,5 y 10 UI de eCG, comparados con el grupo control; a su vez, la dosis de 10 UI provocó un mayor número de ovocitos por hembra que los obtenidos con 5 UI de eCG ($P<0,05$; Tabla 2). El porcentaje de ovocitos que presentó características morfológicas normales por hembra no difirió entre grupos ($P>0,05$; Tabla 2).

El total de mórulas recolectadas por hembra así como el porcentaje de mórulas con características morfológicas normales por hembra fueron independientes de la dosis de eCG utilizada ($P>0,05$; Tabla 3).

Cuando se analizó el efecto de distintas dosis de eCG sobre el cultivo *in vitro* de mórulas recolectadas a partir de hembras con estimulación ovárica, se observó que el porcentaje de diferenciación fue similar entre los grupos estimulados con 5 UI, 7,5 UI y 10 UI de eCG tanto a las 24 horas como a las 48 horas de cultivo ($P>0,05$; Tabla 3)

El porcentaje de *hatching* evaluado a las 48 horas de cultivo fue significativamente superior en las mórulas provenientes de hembras que fueron estimuladas a ovular con 5 UI y 7,5 UI de eCG, comparado con aquellas recolectadas de hembras que recibieron 10 UI de eCG ($P<0,05$; Figura 1). A las 72 y 96 horas de cultivo, no obstante, los valores de *hatching* correspondientes a dicho grupo, fueron semejantes a los obtenidos para el grupo que recibió 5 UI de eCG y continuaron siendo significativamente inferiores a los del

Tabla 1. Efecto de distintas dosis de eCG sobre variables ováricas

Parámetros	Grupos			
	Control	5 UI	7,5 UI	10 UI
Peso (mg)	8,1 \pm 2,3 ^a	11,8 \pm 1,3 ^b	14,7 \pm 2,2 ^c	14,8 \pm 1,7 ^c
Diámetro (mm)	2,7 \pm 0,3 ^a	3,0 \pm 0,1 ^b	3,3 \pm 0,1 ^b	3,2 \pm 0,2 ^b

Valores expresados como promedio \pm desvío estándar del total de ovarios. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Tabla 2. Efecto de distintas dosis de eCG sobre el número total de ovocitos recolectados por hembra y sobre el porcentaje de ovocitos morfológicamente normales

Parámetros	Grupos			
	Control	5 UI	7,5 UI	10 UI
Total de ovocitos*	8,1 ± 1,9 ^a	18,9 ± 6,8 ^{ab}	28,5 ± 9,2 ^{bc}	30,8 ± 12,4 ^c
Porcentaje de ovocitos normales*	63,5 ± 32,8 ^a	73,8 ± 22,7 ^a	63,8 ± 24,8 ^a	70,6 ± 16,1 ^a

*Valores expresados como promedio ± desvío estándar. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas (P<0,05).

Tabla 3. Efecto de distintas dosis de eCG sobre el número total de mórulas recolectadas por hembra y sobre los porcentajes de mórulas morfológicamente normales y de diferenciación *in vitro*.

Dosis de eCG	Mórulas totales/hembra*	Mórulas normales/hembra* (%)	Diferenciación 24 h cultivo (%)	Diferenciación 48 h cultivo (%)
5 UI	23,8 ± 11,3	53,3 ± 36,0	75,7	76,6
7,5 UI	32,6 ± 5,6	80,7 ± 16,0	81,1	82,2
10 UI	31,1 ± 14,0	69,2 ± 25,5	74,2	78,0

* Valores expresados como promedio ± desvío estándar.

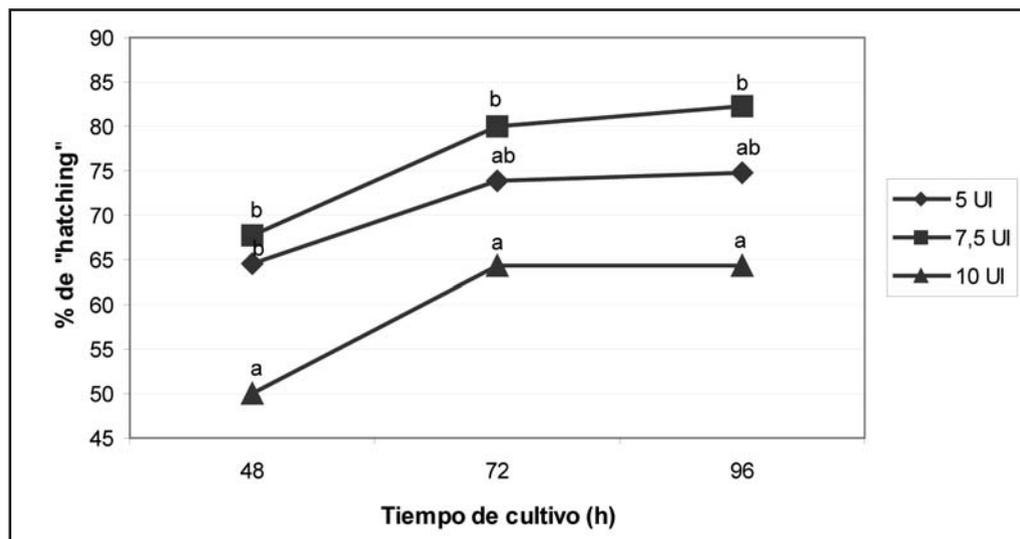


Figura 1: Efecto de distintas dosis de eCG sobre el porcentaje de *hatching* a las 48, 72 y 96 horas de cultivo. a-b: Letras distintas en un mismo tiempo de cultivo indican diferencias significativas (P<0,05)

grupo estimulado con 7,5 UI de eCG ($P < 0,05$; Figura 1).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo, coinciden con los de otros autores en que los tratamientos superovulatorios aplicados en animales de experimentación usados como modelos para el estudio de fenómenos relacionados con la reproducción y el desarrollo temprano, resultan en un elevado número de ovocitos y/o embriones^{6,7,9,12,15}.

Las variaciones observadas en cuanto a peso y diámetro ováricos en hembras estimuladas con diferentes dosis de eCG comparados con aquellos de animales sin estimulación hormonal, estarían relacionadas principalmente con cambios que ocurren en los componentes somáticos de los folículos durante la fase preovulatoria con fenómenos de crecimiento y diferenciación¹⁴ que, posteriormente de ocurrir la múltiple ovulación, y bajo la influencia de cambios hormonales, producirían cambios morfológicos ováricos cuantitativos.

Si bien el número de ovocitos obtenidos por hembra bajo las condiciones del presente trabajo, resultó significativamente superior cuando se administraron 7,5 o 10 UI de eCG comparado con aquellos obtenidos en el grupo de animales sin estimulación ovárica, es de gran importancia el hecho de que el porcentaje de ovocitos con características morfológicas normales sea independiente de la dosis utilizada para realizar la estimulación ovárica, lo cual estaría indicando que a pesar de estar alterado el nivel de gonadotropinas circulantes y madurar en un medio diferente a aquel de ovocitos provenientes de animales no estimulados hormonalmente^{4,7}, las características morfológicas no se ven modificadas.

Es importante el resultado obtenido en

cuanto al número y al porcentaje de mórulas con características morfológicas normales bajo un protocolo de estimulación ovárica en base a eCG y hCG; no obstante, al momento de su utilización, debe considerarse la existencia de datos que indican que la estimulación hormonal genera cambios a nivel folicular, oviductal y uterino que pueden afectar la calidad ovocitaria y con ello su capacidad de ser fertilizados¹⁷ y el desarrollo embrionario pre y postimplantacional^{2,3,17}. Si bien los trabajos mencionados, claramente han demostrado un efecto negativo de la estimulación ovárica sobre el desarrollo, nuestro objetivo fue determinar si había algún efecto de la estimulación con diferentes dosis de eCG sobre la capacidad de formación de blastocistos y de protruir a través de la zona pelúcida de mórulas obtenidas a partir de hembras que recibieron diferente estimulación hormonal. Las mórulas recolectadas en este trabajo, tuvieron la posibilidad de desarrollarse dentro del ambiente materno durante tres días y sin embargo en término de morfología no se vieron afectadas, por lo tanto si realmente existía un efecto dependiente de la dosis de eCG sobre la capacidad de desarrollo de las mismas, probablemente se manifestara en el transcurso del cultivo *in vitro*. Efectivamente, una vez en el cultivo, observamos que si bien la formación de blastocistos no fue dependiente de la dosis de eCG utilizada, el proceso del *hatching* sí resultó modificado por el nivel de estimulación ovárica empleado, reafirmando el concepto observado en trabajos previos¹⁶ de que el *hatching* y la diferenciación son procesos regulados en forma separada durante el desarrollo preimplantacional. Por otro lado, los valores inferiores obtenidos con la mayor dosis de eCG utilizada en este trabajo, indicarían que el proceso de protrusión no

responde, necesariamente, en forma directa a una mayor estimulación hormonal, sino que lo hace en respuesta a una dosis óptima. A su vez, los resultados que muestran la dependencia de la protrusión a través de la zona pelúcida con la dosis de eCG son importantes, considerando que dicho proceso tiene relación directa con la implantación embrionaria tal como lo han demostrado Gordon y Dapunt⁵ quienes, utilizando un modelo de *hatching* asistido, obtuvieron altos porcentajes de implantación en embriones de ratón transferidos a hembras receptoras postulando que un retardo en el *hatching* y con ello la pérdida del período de receptividad uterina, serían los causales de fallas en el proceso de implantación. Es importante considerar, luego de evaluar nuestros resultados y los reportados en la bibliografía consultada, el hecho de analizar diferentes variables cuando se utilizan protocolos de estimulación ovárica porque no todos responden de igual manera y durante el desarrollo pre y postimplantacional los procesos que ocurren son tiempo y espacio dependientes.

CONCLUSIÓN

Se concluye que, bajo las condiciones del presente estudio, la tasa de recolección de mórulas, así como los porcentajes de ovocitos y mórulas con características morfológicas normales, son independientes de la dosis de eCG utilizada, no obstante el fenómeno de *hatching* evaluado en condiciones de cultivo *in vitro* para embriones de ratón resulta afectado según la dosis de eCG utilizada, indicando que la estimulación ovárica modifica la calidad embrionaria puesta de manifiesto en la capacidad de los embriones preimplantacionales de protruir a través de la zona pelúcida.

BIBLIOGRAFÍA

1. BROGLIATTI, G.M.; SALAMONE, D.F.; ADAMS, G.P. 1997. Ovarian follicular waves synchronization and superstimulation in prepubertal calves. *Theriogenology* 47 (6): 1253-1264.
2. ERTZEID, G.; STORENG, R. 1992. Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. *J Reprod Fertil* 96 (2): 649-655.
3. ERTZEID, G.; STORENG, R. 2001. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 16 (2): 221-225.
4. FOOTE, R.H.; ELLINGTON, J.E. 1988. Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology* 29 (1): 111-123.
5. GORDON, J.W.; DAPUNT, U. 1993. Restoration for normal implantation rates in mouse embryos with a hatching impairment by use of a new method of assisted hatching. *Fertil Steril* 59 (6): 1302-1307.
6. KANTER, M.; YILDIZ, C.; MERAL, I.; KOC, A.; TASAL, I. 2004. Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. *Theriogenology* 61 (2-3): 393-398.
7. LEVEILLE, M.C.; ARMSTRONG, D.T. 1989. Preimplantation embryo development and serum steroid levels in immature rats induced to ovulate or superovulate with pregnant mares' serum gonadotropin injection or follicle-stimulating hormone infusions. *Gamete Res* 23 (1): 127-138.
8. MACLELLAN, L.J.; WHYTE, T.R.; MURRAY, A.; FITZPATRICK, L.A.; EARL, C.R.; ASPDEN, W.J.; KINDER, J.E.; GROTTJAN, H.E.; WALSH, J.; TRIGG, T.E.; D'OCCHIO, M.J. 1998. Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from zebu (*Bos indicus*) calves: Effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. *Theriogenology* 49 (7): 1317-1329.
9. MCKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. 1998. Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one-

- cell hamster embryos. *Hum Reprod* 13 (3): 724-729.
10. MILLER, B.G.; ARMSTRONG, D.T. 1981. Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotrophin on ovarian function; serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. *Biol Reprod* 25 (2): 261-271.
 11. MURPHY, M.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. 1998. The effects of dose and duration of administration of pFSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers. *Theriogenology* 49 (3): 557-569.
 12. OZGUNEN, K.T.; ERDOGAN, S.; MAZMANOGLU, N.; PAMUK, I.; LOGOGLU, G.; OZGUNEN, T. 2001. Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB/c mice. *Theriogenology* 56 (3): 435-445.
 13. RIESENBERG, S.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B. 2001. Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in German Merino ewes. *Theriogenology* 55 (4): 847-865.
 14. RICHARDS, J.S. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60 (1): 51-89.
 15. SUZUKI, O.; KOURA, M.; NOGUCHI, Y.; TAKANO, K.; YAMAMOTO, Y.; MATSUDA, J. 2003. Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Mol Reprod Dev* 64 (2): 219-25.
 16. TERUEL, M.; CATALANO, R.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. 2005. Regulation of mouse embryo development by autocrine trophic factors. *BIOCELL* 29 (2): 183-186.
 17. VAN DER AUWERA, I.; D'HOOGE, T. 2001. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 16 (6): 1237-1243.
 18. WALTON, F.A.; EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. 1983. Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulate. *J Reprod Fertil* 67 (1): 91-96.