Acta Zool. Mex. (n.s) 81: 105-115 (2000)

DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN EL HAMSTER SIRIO DORADO, *MESOCRICETUS AURATUS* (MAMMALIA: RODENTIA)

Ma. del Carmen NAVARRO-MALDONADO, Demetrio AMBRIZ-GARCÍA, Eduardo MUNDO-REYES, Alfredo TREJO-CORDOVA, Omar HERNÁNDEZ-PÉREZ y Adolfo ROSADO-GARCÍA

Depto. de Biología de la Reproducción.Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa. Av. Michoacán y Purísima, Col. Vicentina, Iztapalapa. México, D.F. CP 09340. MEXICO
e- mail: deme@xanum.uam.mx

RESUMEN

Se analizó el patrón de segmentación embrionaria en el hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) utilizando dos grupos de hembras: 47 hembras nulíparas de 3-4 meses de edad y 39 multíparas (3 partos en promedio) de 7-8 meses de edad. El tiempo de apareamiento se restringió a 15 minutos, y el tiempo de la ovulación se determinó con base en estudios secuenciales de citología vaginal exfoliativa. El mejor momento para obtener embriones de 8 blastómeros se presentó entre las 62 y las 63 horas postcoito en las hembras nulíparas. En las hembras multíparas el tiempo de segmentación fue 2 horas mayor que en las nulíparas. Estos resultados nos permiten proponer que el aumento en la duración de la gestación, que se ha correlacionado con la edad de las hembras, ocurre ya desde las primeras etapas del desarrollo del embrión. Para precisar con exactitud el tiempo de segmentación temprana en el hámster sirio dorado, es indispensable restringir el tiempo de apareamiento y relacionarlo de una manera más precisa con la ocurrencia de la ovulación, y establecer la edad de las hembras y el número de partos. Además, el proceso de segmentación muestra una franca asincronía en las hembras multíparas, pudiéndose recuperar embriones pertenecientes a 4 fases distintas de la segmentación (2, 4, 6 y 8 blastómeros) entre las 60 y las 63 horas postcoito.

Palabras Clave: Desarrollo embrionario, hámster, duración de la gestación, *Mesocricetus*.

ABSTRACT

The pattern of embryonic segmentation in the golden sirian hamster (*Mesocricetus auratus)* was analized using two female groups: 47 nuliparous 3-4 months old females and 39 multiparous (mean 3 parturitions) 7-8 months old females. The mating time was restricted to 15 minutes and the time of ovulation was determined on the basis of secuencial studies of vaginal citology. The best moment to obtain 8-blastomeres embryos was between 62 and 63 hours postcoitus for nuliparous females. In multiparous females the time of segmentation was 2 hours longer in comparison to nuliparous. We propose that the increase in pregnancy duration, that has been correlated with age in females, occurs already during the very early embrionic development stages. In order to estimate the time of early segmentation in the golden sirian hamster, it is neccesary to restrict the mating time and to relate it accurately with the occurrence of ovulation, and to establish the age and

parturition number in females. Besides, the segmentation process shows a clear asyncrony in multiparous females, making possible to recover embryos that belong to 4 distinct segmentation phases (2, 4, 6 and 8 blastomeres) between 60 to 63 hours postcoitus.
Key Words. Embryonic development, hamster, pregnancy duration, *Mesocricetus.*

INTRODUCCION

El hámster sirio dorado ha sido utilizado ampliamente en estudios de reproducción en los últimos 30 años (Bavister, 1995). Esto se debe entre otros factores, a que la producción de estos animales en el bioterio es fácil, la madurez sexual en las hembras se adquiere entre las 4 y las 6 semanas de edad (Magalhaes, 1970), las hembras presentan un ciclo estral de 4 días que es frecuentemente normal y fácilmente predecible por la presencia de signos externos (Magalhaes, 1970; Barnett y Bavister, 1992) y tienen de 10 a 12 animales por camada después de sólo 16 días de gestación. Sin embargo, a pesar de que el hámster sirio dorado fue el primer animal en el que se demostró la posibilidad de realizar la fertilización *in vitro* (Yanagimachi y Chang, 1964) y de que más del 90% de los ovocitos fertilizados *in vitro* inician la segmentación normalmente, la posibilidad de lograr el desarrollo embrionario *in vitro* más allá de la etapa de 2 blastómeros ha tropezado con numerosas dificultades relacionadas con requerimientos metabólicos que todavía no han podido ser satisfactoriamente entendidos (Bavister, 1995).

Debido a estas dificultades del desarrollo *in vitro* del embrión de hámster sirio dorado y a la necesidad de nuestras investigaciones de obtener embriones de ocho blastómeros para estudios de determinación del sexo, cultivos *in vitro*, transferencia embrionaria y clonación, se decidió seguir el esquema establecido por Austin (1956). Siguiendo los tiempos señalados por este autor para obtener embriones de ocho blastómeros por lavado del aparato reproductor femenino, se encontró que en nuestros resultados los tiempos para la recuperación de embriones en esta etapa de la segmentación eran muy diferentes. Después de una amplia búsqueda en la literatura especializada respecto al establecimiento de los tiempos de segmentación *in vivo* en el hámster sirio dorado, fue evidente que después del trabajo de Austin (1956) no se ha dado gran importancia a la necesidad de determinar con mayor precisión los tiempos de segmentación en esta especie animal (Sato y Yanagimachi, 1972; Mizoguchi y Dukelow, 1981; Bavister *et al*. 1984; Barnett y Bavister, 1992; Bavister, 1995).

El conocimiento de los tiempos involucrados *in vivo* en las diferentes fases del desarrollo embrionario previo a la implantación requiere de una mayor precisión en la determinación del momento en el que ocurren la fertilización y la singamia, así como

de las variables que participan durante la segmentación del huevo (Austin, 1956; Mizoguchi y Dukelow, 1981). Por ello se decidió estudiar *in vivo* el proceso de segmentación del huevo en el hámster sirio dorado: 1) precisando el tiempo en que ocurrirá la ovulación mediante citología exfoliativa vaginal, 2) restringiendo a 15 minutos el tiempo de apareamiento, y 3) estudiando las etapas de la segmentación a tiempos preseleccionados (60-69 horas) en dos grupos de hembras, unas nulíparas jóvenes y otras multíparas de mayor edad, para tratar de establecer la influencia de la edad y el número de partos en el patrón de segmentación previo a la implantación.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 86 hembras divididas en dos grupos experimentales, uno de 39 hembras multíparas (media de 3 partos), de edades de 7 a 8 meses y un peso promedio de 168 g, y el otro de 47 hembras jóvenes, nulíparas de edades entre 3 y 4 meses y peso promedio de 128 g. Se alojaron por grupos de 6 hembras en cajas de acrílico, con cama de viruta. Los animales fueron mantenidos en un ambiente controlado a 26˚C de temperatura promedio, fotoperiodo de 14 horas luz por 10 de oscuridad y alimentados *ad-libitum* con nutricubos Purina y agua.

Para conformar los dos grupos experimentales, sólo se utilizaron las hembras que mostraron estricta regularidad en la duración de sus ciclos estrales misma que fue demostrada por medio de estudios secuenciales de citología vaginal exfoliativa efectuada durante 12 días (3 ciclos) con base en lo descrito por Magalhaes (1970), y Mizoguchi y Dukelow (1981); y en las que 10 horas después de la imagen clara del proestro ocurrió la aparición de abundante secreción vaginal indicadora del final de la fase de estro, como lo describió Magalhaes (1970). Con base en lo descrito por Orsini (1961) y Magalhaes (1970), tres horas después de la demostración clara del proestro (8 horas antes de la aparición de secreción vaginal abundante y 84 horas después de la última aparición de la secreción vaginal abundante), las hembras fueron colocadas individualmente en cajas de acrílico con machos de fertilidad y experiencia comprobadas. Para asegurar que las hembras fueran inseminadas, los apareamientos se efectuaron al final del proestro restringiendo la duración de los mismos a 15 minutos. El momento de la ocurrencia de la ovulación fue determinado tomando como base la presencia clara del proestro (8 horas posteriores al término del proestro). La ocurrencia del coito se estableció por observación directa de la conducta de la pareja y se verificó por la presencia de espermatozoides en el contenido vaginal (Blaha, 1964a). Siguiendo las recomendaciones de Mizoguchi y Dukelow (1981) las hembras inseminadas fueron

sacrificadas por dislocación cervical entre 60 y 69 horas postcoito para la obtención de los embriones. Posteriormente se colocaron en decúbito dorsal realizando una incisión por la línea media ventral, abarcando piel, músculo y peritoneo. Se disecó el aparato reproductor y se colocó en un vidrio de reloj siliconizado. Se lavó con solución buffer de fosfatos (PBS de Dulbecco) a 37ºC (Hogan *et al*. 1986) y se limpió de grasa, vasos y detritos. Se disecaron los ovarios y los oviductos y se colocaron por separado en cajas de cultivo de 4 pozos preparadas con PBS. Para mejorar el método de obtención de embriones de los oviductos, además del lavado recomendado por otros autores (Sato y Yanagimachi, 1972; Nieder y Caprio, 1990) éstos fueron cortados longitudinalmente con el bisel de una aguja hipodérmica calibre 27, bajo el microscopio estereoscópico y se lavaron con PBS sobre el mismo pozo. El tejido remanente se desechó.

Los cuernos uterinos fueron perfundidos por separado desde la región uterotubárica siguiendo la técnica de Nieder y Caprio (1990) con 1 mL de PBS, recogiendo la solución en tubos de centrífuga de policarbonato de 12 mL. Los embriones se dejaron sedimentar durante 10 minutos. Posteriormente el sedimento se recuperó con una pipeta Pasteur siliconizada y se colocó en otra caja de 4 pozos. Finalmente los embriones obtenidos de los oviductos y cuernos uterinos fueron contados y se determinó su etapa de segmentación en el microscopio, sobre una termoplatina a 37ºC.

Los periodos de tiempo de las fases de la segmentación embrionaria se establecieron tomando como tiempo cero el momento del coito, que en este estudio fue precisado por observación visual.

La etapa de segmentación de los embriones obtenidos se determinó con base en el número par de los blastómeros presentes, o el número par inmediato superior. En los embriones de ocho blastómeros se consideraron también aquellos que se encontraban compactados.

RESULTADOS

El lavado del aparato genital femenino demostró que, mientras que en los oviductos es posible encontrar embriones de 2, 4, 6 y 8 blastómeros, estos últimos no compactados, en los cuernos uterinos se encontraron exclusivamente embriones de ocho blastómeros, muchos de ellos compactados o en vías de compactación, y mórulas (Fig. 1).

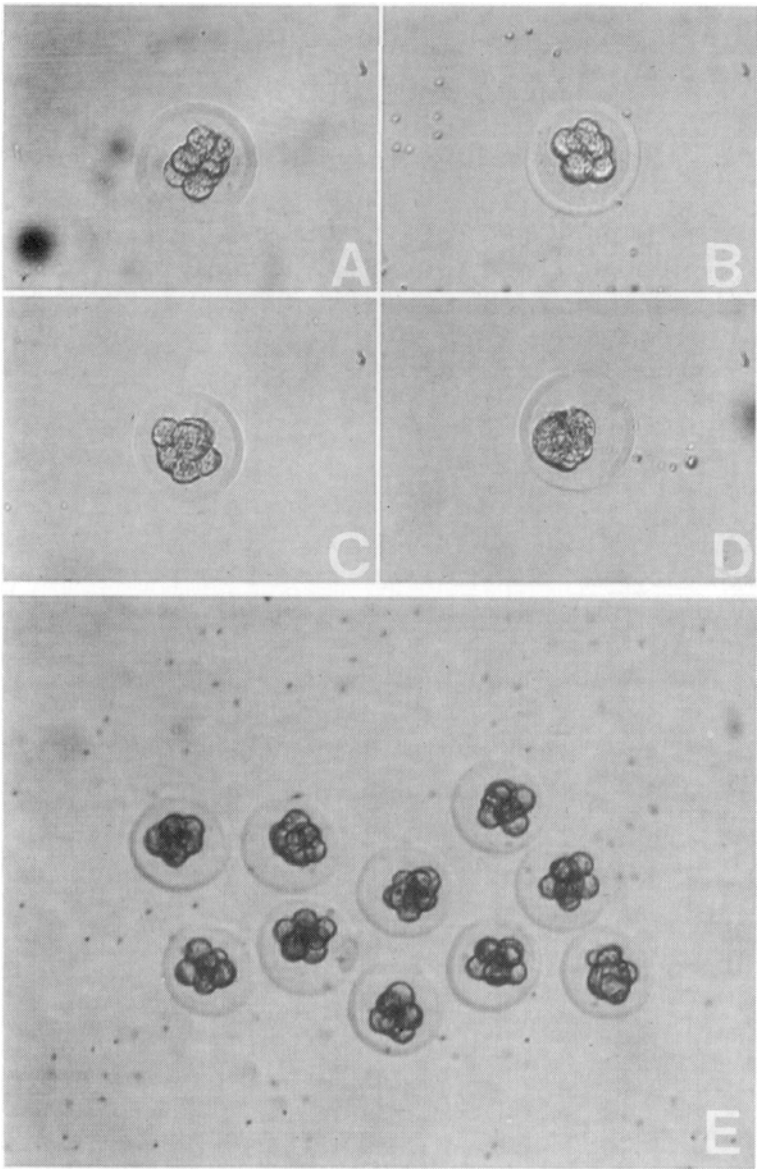


Figura 1

Embriones de ocho blastómeros de hámster sirio dorado (A,B,C y D a 140X). A) sin compactación. B) y C) en proceso de compactación. D) compactado. E) embriones de ocho blastómeros obtenidos de oviductos y cuernos uterinos entre 62 y 63 horas postcoito (110X).

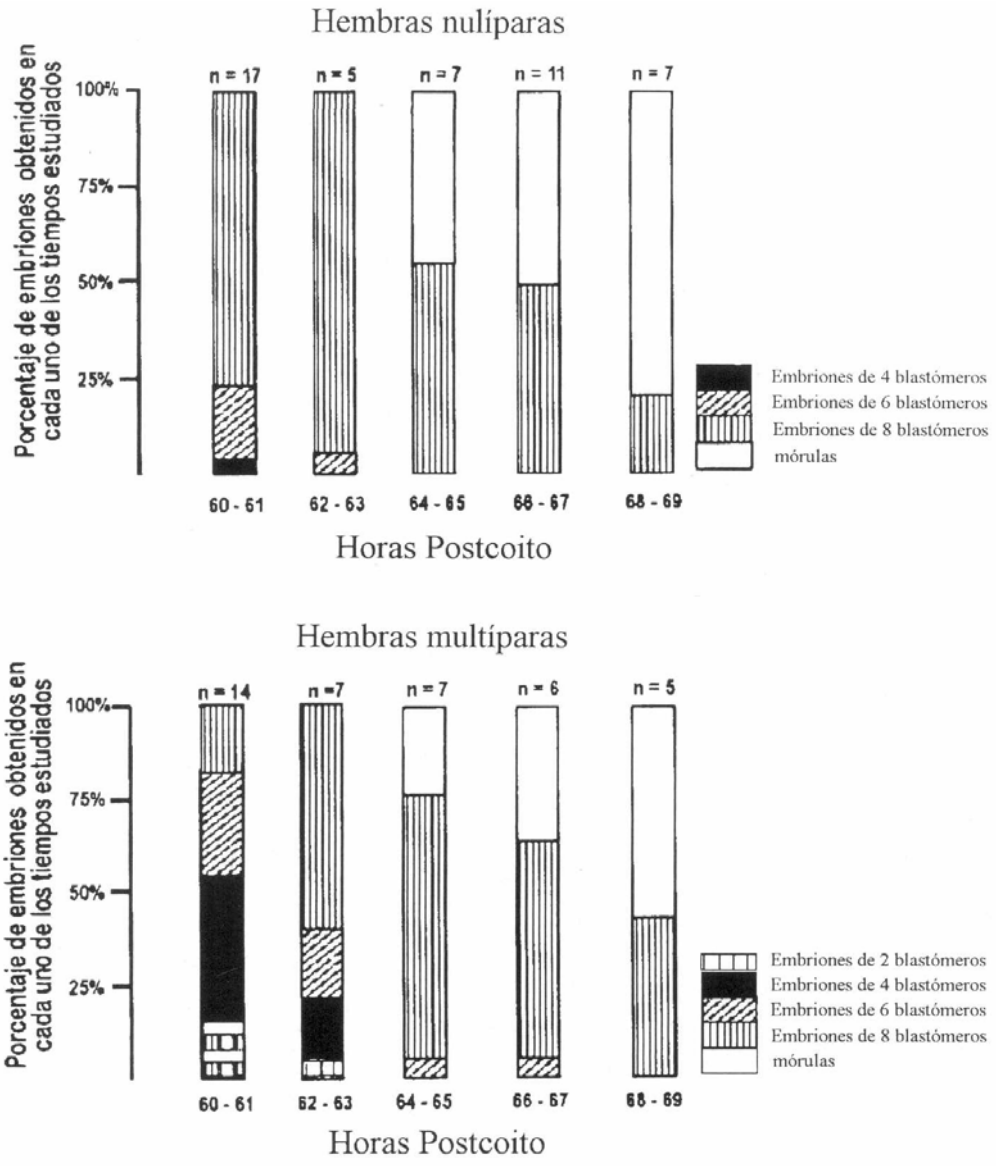


Figura 2
Patrón de segmentación en hembras nulíparas y multíparas de hámster sirio dorado entre 60 y 69 horas postcoito.

Las hembras nulíparas jóvenes presentaron un patrón de segmentación más rápido que las hembras maduras multíparas (Fig. 2). En las hembras nulíparas no se encontraron embriones de menos de 4 blastómeros en ninguno de los tiempos estudiados. Por el contrario, en las multíparas se pudieron observar embriones de 2 blastómeros hasta las 63 horas postcoito. Asimismo, el desarrollo embrionario en las hembras multíparas mostró una importante tendencia a retrasarse, de manera que los embriones de 4 y 6 blastómeros se observaron entre las 60 y las 63 horas postcoito, es decir hasta 2 horas más tarde que en las hembras nulíparas (Fig. 2).

Las hembras nulíparas (n=47) tuvieron un patrón de segmentación diferente al que mostraron las hembras multíparas (n=39) (Fig. 2). En las nulíparas se observó el porcentaje máximo de embriones de ocho blastómeros (90% del total de embriones obtenidos) en el período comprendido entre las 62 y las 63 horas postcoito, mientras que en las multíparas esto sucedió dos horas después (entre 64-65 horas) y el porcentaje de embriones de ocho blastómeros fue menor (70%). Además, se observó que en las multíparas el porcentaje de embriones de ocho blastómeros desciende gradualmente del 70% (entre las 64 y 65 horas) al 42% a las 68-69 horas postcoito, siendo a este último tiempo cuando se observan un poco más del 60% de embriones en la fase de mórula. En lo que respecta a las hembras nulíparas, éstas tuvieron únicamente el 22% de embriones en estado de ocho blastómeros a las 68-69 horas postcoito, mientras que el porcentaje de mórulas fue casi del 80% (Fig. 2).

Las hembras nulíparas jóvenes mostraron una mejor sincronía del proceso de segmentación. En efecto, mientras que en las hembras nulíparas hubo una clara predominancia de sólo dos fases de la segmentación (6 y 8 blastómeros) a las 62-63 horas postcoito, en las multíparas fue posible obtener porcentajes importantes de embriones en 4 diferentes etapas de segmentación (2, 4, 6 y 8 blastómeros) a las 60-63 horas postcoito (Fig. 2).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los tiempos de segmentación embrionaria observados en este estudio difieren de lo encontrado por Austin (1956), por Sato y Yanagimachi (1972) y por Bavister *et al*. (1984). Austin (1956) y Sato y Yanagimachi (1972) señalan que el mayor número de embriones en estado de ocho blastómeros se obtiene a las 64-67 horas postcoito y los blastocistos hasta las 71-79 horas. Estos autores no mencionan con precisión el momento de la segmentación en que es posible identificar mórulas, dado que permitieron que el apareamiento se prolongara durante toda la noche, especulando

después sobre el tiempo probable de la ovulación. En nuestros experimentos se restringió el tiempo de apareamiento y se precisó el tiempo de la ovulación ya que las hembras eran apareadas sólo después de observar una fase clara del proestro, que es considerada por algunos autores como la fase del ciclo estral previa a la descarga vaginal postovulatoria más claramente identificable (Austin, 1956; Magalhaes, 1970). Dependiendo del número de partos de las hembras, el momento con mayor probabilidad para obtener embriones de ocho blastómeros es entre las 62 y las 63 horas postcoito para las hembras nulíparas y entre las 64 y las 65 horas postcoito para las multíparas, lo cual es considerablemente más temprano que lo encontrado por Austin (1956) o por Sato y Yanagimachi (1972).

Bavister *et al*. (1984) mencionan que de las 54 a las 62 horas posteriores al tiempo estimado de la activación del ovocito se encuentran el 50% de los embriones de ocho células en las hembras jóvenes, después de inducir la superovulación mediante la aplicación de gonadotrofinas, y predijeron el momento de la activación del ovocito basándose en el trabajo de Sato y Yanagimachi (1972) permitiendo que el apareamiento se prolongara durante toda la noche. Conforme a nuestros resultados, podemos estimar con precisión que la activación del ovocito ocurrió 8-10 horas después del coito, lo cual permite afirmar que en las hembras nulíparas la mayor ocurrencia de embriones de ocho blastómeros se da entre 50-51 y 56-57 horas posteriores a la fertilización (entre 60 y 67 horas postcoito) (Fig. 2). Estos tiempos son menores a los reportados por Bavister *et al*. (1984) en las hembras multíparas. Nuestros resultados indican que si se quiere precisar con mayor exactitud los tiempos de la segmentación embrionaria en el hámster sirio dorado, es indispensable: a) restringir el tiempo de apareamiento y relacionarlo con la ocurrencia de la ovulación y b) establecer la edad y número de partos en las hembras.

El patrón de segmentación embrionaria de las hembras multíparas evaluadas, está retrasado 2 horas con respecto al de las hembras nulíparas posiblemente debido a una variación del tiempo de gestación correlacionada con la mayor edad, lo cual ha sido previamente observado en algunas especies animales. Soderwall *et al*. (1960) mencionan que las hembras de un mes de edad tienen un período de gestación de 373 horas, mientras que las de 14 meses de edad lo tienen de 402 horas. Según estos autores las hembras de 4 meses de edad tienen una gestación de 378 horas y las de 8 meses de 386 horas.

La prolongación de la gestación relacionada con el avance en la edad de las hembras puede ser explicado por un retraso significativo en las etapas de segmentación temprana del huevo. Se ha demostrado que aquellos embriones que se dividen tempranamente son los que tienen mayores probabilidades de implantarse

(Edwards, 1998; Kubisch *et al*. 1998; Lonergan *et al*. 1999), por lo que es importante tomar en cuenta este retraso en la segmentación en las especies animales de tal forma que pueda tenerse un mejor control en la tasa de implantación y en la fecundidad. Nuestros resultados, al igual que los de Soderwall *et al*. (1960) y los de Parkening y Chang (1976), indican que no hay diferencias ni en la tasa de ovulación, ni en la tasa de fertilización entre las hembras nulíparas jóvenes (3-4 meses de edad) y las hembras multíparas (7-8 meses de edad).

La asincronía en la segmentación embrionaria encontrada en este trabajo para las hembras multíparas es de importancia ya que puede ser uno de los fundamentos de la relación que se ha establecido entre la edad y número de partos de las hembras con una reducción progresiva de la fertilidad y un aumento en el número de anomalías embrionarias. Finn (1962) encontró que los embriones de hembras viejas tienen menor viabilidad que los de las hembras jóvenes. Parkening y Chang (1976) y Mizoguchi y Dukelow (1981) confirmaron que el incremento en la edad de la hembra reduce la fertilidad e incrementa las anormalidades de las crías. En humanos se ha visto que conforme la edad avanza, aparece una disminución en la tasa de implantación de los embriones después de la fertilización *in vitro* (van Kooij *et al*. 1996). Esta relación entre edad y número de partos con las alteraciones en el proceso reproductivo se ha tratado de dilucidar con anterioridad (Ortiz, 1955; Blaha, 1964a; Blaha, 1964b; Child *et al*. 1997), pero lo cierto es que el conocimiento sobre los factores que regulan el proceso de segmentación *in vivo* del huevo son todavía poco conocidos (Lonergan *et al*. 1999). Los resultados encontrados respecto a la asincronía existente en este proceso en las hembras multíparas podrían ser un buen punto de partida para estudiar los factores de regulación.

Considerando que uno de los propósitos del presente trabajo fue el delimitar con exactitud los tiempos postcoito en los cuales fuera posible obtener una alta proporción de embriones en etapas prefijadas de la segmentación previa a la implantación, tomando como base los datos de otros autores (Sato y Yanagimachi, 1972), hemos determinado que para obtener con precisión una alta proporción de embriones en etapas conocidas de la segmentación, es indispensable un control del tiempo de realización del coito en relación con un parámetro bien establecido de la ocurrencia de la ovulación. Esto es, que los animales sean apareados al inicio del estro 8 horas antes de que ocurra la ovulación.

Otro aspecto de gran importancia observado en nuestro estudio, fue que la prolongación de la gestación en las hembras multíparas que ha sido mencionada por Soderwall *et al*. (1960), en comparación con las hembras nulíparas, ya existe desde las primeras etapas de la segmentación embrionaria. También se encontró que la

regulación del proceso de segmentación parece ser más estricto en las hembras nulíparas, lo cual debe tenerse presente para muchos otros estudios de reproducción asistida y requiere de mayor experimentación para establecer los factores bio-endocrinológicos involucrados. A diferencia de la información obtenida en un estudio efectuado en los primeros años de la investigación sobre los procesos de la segmentación *in vivo* (Blaha, 1964a), en el presente estudio se confirmó que la migración del embrión del oviducto a los cuernos uterinos se realiza en la fase de ocho blastómeros, probablemente al mismo tiempo que el embrión experimenta el proceso de compactación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al CONACYT y a P/FOMES 98-35-27, por los apoyos parciales otorgados para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

Austin, C.R. 1956. Ovulation, fertilization and early cleavage in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. R. Microsc. Soc.* 75:141.

Barnett, D.K. & B. Bavister. 1992. Hypotaurine requirement for in vitro development of golden one-cell embryos into morulae and blastocyst and production of term offspring for in vitro-fertilized ova. *Biol. Reprod*. 47:297-304.

Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod*. 1:91-148.

Bavister, B.D., M. Lorraine & G. Lieberman. 1984. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 28:235-247.

Blaha, G.C. 1964a. Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova. *Anat. Rec.* 150:413-416.

_____. 1964b. Reproductive senescence in the female golden hamster. *Anat. Rec.* 150:405-412.

Child, T.J., W.L. Ledger & D.H. Barlow. 1997. Number of embryos transferred and age of mother. *Fert. Steril*. 68:746-747.

Edwards, R.G. 1998. New concepts in embryonic growth and implantation. *Hum. Reprod.* 13 Suppl. 3:271-283.

Finn, C.A. 1962. Embrionic death in aged mice. *Nature* 174:499-500.

Hogan, B., F. Constantini & Lacy, E. 1986. *Manipulating the mouse embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, EUA. 332 p.

Kubisch, H.M., M.A. Larson & R.M. Roberts. 1998. Relationship between age of blastocyst formation and interferon- secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev*. 49:254-260.

Lonergan, P., H. Khatir, F. Piumi, D. Rieger, P. Humblot & M.P. Boland. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos*. J. Reprod. Fert*. 117:159-167.

Magalhaes, H. 1970. Hamsters. Pp 250-271. I*n:* Hafez, E.S.E. (Ed.) *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals.* De. Lea & Fabiger, Philadelphia, EUA.

Mizoguchi, H. & W.R. Dukelow. 1981. Fertilizability of ova from young or old hamsters after spontaneus or induced ovulation. *Fert. Steril.* 35(1):79-83.

Nieder, G. & T. Caprio. 1990. Early embryo development in the siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Mol. Reprod. Dev.* 27:224-229.

Orsini, M. 1961.The external vaginal phenomena characterizing the stages of the estrous cycle, pregnancy, pseudopregnancy, lactation, and the anestrous hamster. *Mesocricetus auratus.* Water house. *Proc. Anim. Care Panel* 11:193.

Ortiz, E. 1955. The relation advancing age to reactivity of the reproductivity system in the female hamster. *Anat. Rec.* 122:517-537.

Parkening, T.A. & M.C. Chang. 1976. *In-vitro* fertilization of ova from senescent mice and hamsters. *J. Reprod. Fert*. 48:381-383.

Sato, A. & R. Yanagimachi. 1972. Transplantation of preimplantation hamster embryo. *J. Reprod. Fert.* 30:329-332.

Soderwall, A.L., H.A. Kent, C.L. Turbyfill & A. Britenbaker. 1960. Variation in gestation length and litter size of the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *J. Geront.* 15:246-248.

Van Kooij, R.J., C.W.N. Looman, J.D.F. Habbema, M. Dorland & E.R. te Velde. 1996. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vivo fertilization. *Fert. Steril*. 66:769-775.

Yanagimachi, R. & M.C. Chang. 1964. *In vitro* fertilization of the golden hamster ova. *J. Exp. Zool*. 156:361-376.

Recibido: 10 de marzo 2000
Aceptado: 9 de agosto 2000