



INFORME

CÓDIGO: BIOULA-CYTOREG

TÍTULO: Evaluación experimental del efecto de la formulación Cytoreg® sobre parámetros de fertilidad y reproductivos en ratones *C57BL/6//BIOU*.

LUGAR DE DESARROLLO: BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES- MÉRIDA – VENEZUELA.

Emitido por:

**Nombre: Dra. Rosa De Jesús
Prof. Titular Universidad de Los Andes.**

FEBRERO, 2019



PRUEBAS DE EFECTO TERATOGENICO.

Los procedimientos aplicados estuvieron avalados por el Comité de Ética del Bioterio – CE BIOULA – de acuerdo a AVAL N° CE BIOULA/072.

1. PARTE I. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA FORMULACION CYTOREG SOBRE CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE LAS HEMBRAS

- 1.1. Monitorear el ciclo estral bajo la administración de la formulación Cytoreg® en los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*
- 1.2. Determinar el peso de cada uno de los ovarios de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*
- 1.3. Determinar el peso del útero de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

2. PARTE II. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA FORMULACION CYTOREG SOBRE CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE LOS MACHOS

- 2.1. Determinar el peso de cada uno de los testículos de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*
- 2.2. Determinar el peso de cada uno de los epidídimos de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*
- 2.3. Evaluar la movilidad espermática de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*
- 2.4. Determinar concentración espermática de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*
- 2.5. Identificar cada una de las morfologías de la cabeza de los espermatozoides de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*.

3. PARTE III. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA FORMULACION CYTOREG SOBRE LA REPRODUCCION

- 3.1. Determinar el número de cuerpos lúteos en cada uno de los ovarios de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*
- 3.2. Cuantificar el número de embriones vivos en cada uno de los cuernos uterino de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*
- 3.3. Cuantificar el número de embriones muertos en cada uno de los cuernos uterinos de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*.
- 3.4. Cuantificar el número total de embriones en los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*



Analisis estadístico

Se uso la prueba estadística de los rangos con signo de Wilcoxon, por ser esta una prueba no paramétrica, que permite comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. El programa estadístico usado fue el Statistix10.

Modelo Biológico

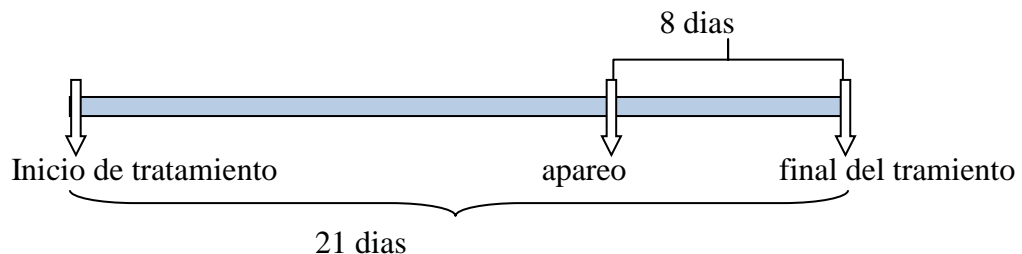
Se usaron un total de 80 ratones de la línea consanguínea *C57BL/6//BIOU*, producidos y mantenidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes. El total de ratones usados fue de 40 ratones hembras y 40 machos, de 8 a 10 semanas de edad (25-30 g), distribuidos de la siguiente forma: 20 ratones machos y 20 ratones hembras del grupo experimental que consumen la formulación del Cytoreg y el grupo control por 20 ratones machos y 20 ratones hembras que no consumen la formulación.

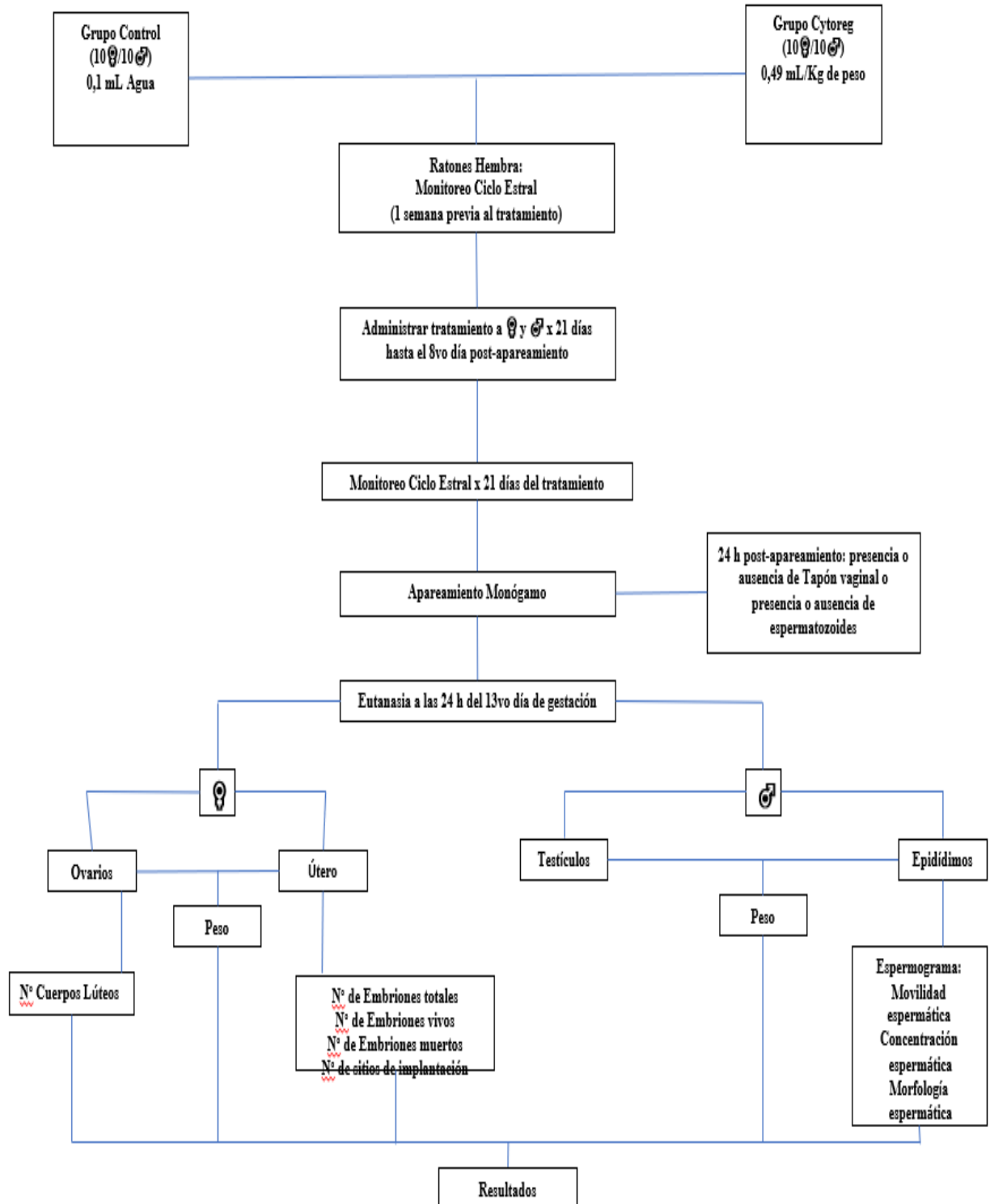
Los animales se alojaron individualmente en cajas T2, para el apareamiento monógamo (1 hembra x 1 macho). Se alojaron en un ambiente con 12h luz/12h oscuridad, con alimento tratado calóricamente (1min/121°C) y agua esterilizada (10min/121°C), ambos para el consumo a voluntad de los animales (Cuervo, 2012).

Diseño experimental / ESQUEMAS DE TRATAMIENTOS

I. PRUEBA DE FERTILIDAD

Administración del Cytoreg durante 21 días hasta el día 8vo post apareamiento.





Esquema de procedimiento desarrollado.



El apareamiento se verifico por presencia del tapon vaginal y/o presencia o ausencia de espermatozoides. El ciclo estral se monitoreo durante los 21 dias de tratamiento. Las hembras se secarifican 13 dias post apareamiento.

Para el monitoreo del ciclo estral, se realizaron lavados vaginales. Para la toma de las muestras, los ratones hembras se sujetaba y se le colocaba una cantidad aproximadamente 0,15 mL de solución fisiológica con una pipeta de plástico en el conducto vaginal, se realizaba el lavado vaginal y la muestra se extraía por succion y se colocaba en un portaobjeto, se le colocaba un cubreobjeto, y se observaba al microscopio con objetivo de 10X y 40X, para identificar las células presentes. El monitoreo se realizo siempre a la misma hora durante el tiempo del ensayo.

Para el logro de los objetivos de pesaje de ovarios, utero, contaje de cuerpos luteos, embriones implantados, embriones vivos y muertos, se realizo necropsia a las hembras en los tiempos correspondientes, y para pesaje de testículos, epidididmo, concentración de esperma, movilización espermática y morfología de los espermatozoides, se realizara necropsia a los machos, para el sacrificio se uso un método de exceso de anestesia inhalatoria, eufluorano.

Resultados

1. PARTE I. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA FORMULACION CYTOREG SOBRE CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE LAS HEMBRAS.

1.1. Monitorización del ciclo estral bajo la administración de la formulación Cytoreg® en los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

El monitoreo consistio en determinar la etapa del ciclo estral en la cual se encontraba la hembra, lo que permitio registrar el tiempo de duración completo de las distintas etapas asi como la frecuencia de las mismas. El tiempo de duración completo del ciclo estral esta estimado en 4 a 5 días, constituido por 4 etapas: diestro, proestro, estro y metaestro, cada una con un estimado de: dos a tres días para el diestro, doce horas a dieciocho horas para el proestro, doce horas para el estro, de 10 a 14 horas para el metaestro.

En el Gráfico 1 se muestra el promedio de la duracion del ciclo estral de los ratones hembras para cada grupo de ratones tanto para el tratado como para el control. Se puede observar que el ciclo estral para el grupo control duró 6,56 días, mientras que el ciclo estral del grupo experimental Cytoreg duró 5,21, es decir, aproximadamente 1,35 días de diferencia. El análisis estadístico a través de la prueba de la sumatoria de los signos de Wilcoxon no presento diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos ($p = 0,4148$; $p > 0,05$).

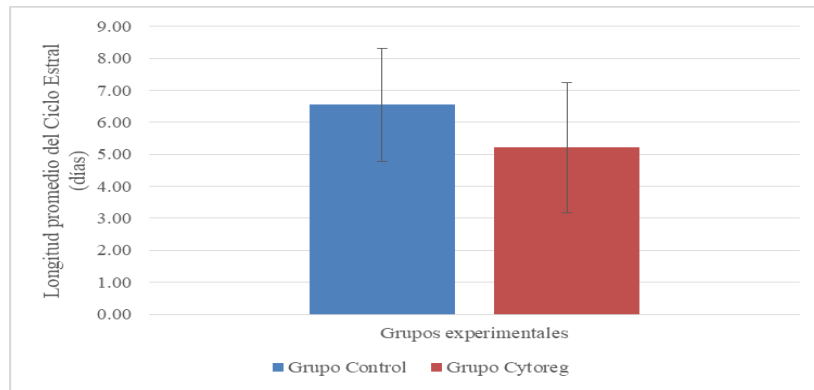


Gráfico 1. Medias aritméticas de la longitud del ciclo estral por grupos de investigación

En el Gráfico 2, se muestra la frecuencia promedio de cada una de las etapas del ciclo estral de los ratones hembras para cada grupo experimental. Se observaron diferencias en la frecuencia para cada etapa del ciclo entre los grupos de animales tratados y control, la etapa de proestro y el estro presentaron mayor frecuencia en el control que el grupo tratado con Cytoreg, y las etapas del metaestro y el diestro, presentaron mayor frecuencia en el grupo tratado Cytoreg. A pesar de estas observaciones, el análisis estadístico mediante la prueba de la sumatoria de los signos de Wilcoxon, no presento diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias promedios entre los grupos experimentales y los controles, para cada etapa del ciclo estral (Proestro: $p = 0,3627$; Estro: $p = 0,2084$; Metaestro: $p = 0,5076$; Diestro: $p = 0,4446$ $p > 0,05$).

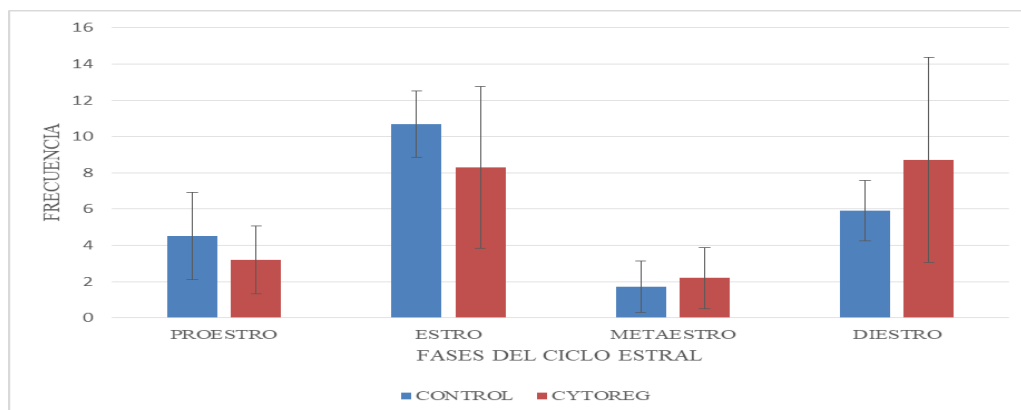


Gráfico 2. Frecuencias de cada una de las etapas del ciclo estral en los ratones hembras de los grupos del ensayo.

Conclusión: Ni el tiempo duración del ciclo estral, ni la frecuencia de las etapas del ciclo estral de los ratones hembras tratadas con la formulación del Cytoreg, presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los mismos parámetros los ratones que no fueron tratados con la formulación.



1.2. Peso de cada uno de los ovarios de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

El peso del ovario derecho del grupo control fue de 0,0064g mientras que el del grupo tratado con Cytoreg fue de 0,00425g, siendo de mayor peso el ovario del grupo control. La estadística no presentó diferencias significativas con un valor de $p = 0,121$ para un $p > 0,05$ (Tabla 1) y un nivel de confianza de 95%. En el caso del peso del ovario izquierdo, el ovario del grupo tratado con Cytoreg el peso fue algo mayor 0,00435g, en relación al del grupo control, 0,0041g, estadísticamente no presentaron diferencias significativa al comparar los pesos, obteniéndose un valor de $p > 0,05$ ($p = 0,940$), (Tabla 1).

1.3. Peso del útero de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

En relación al peso del útero del grupo control se obtuvo una media igual a 1,4156g siendo mayor que el útero del grupo experimental Cytoreg la cual fue de 1,24199 g. La prueba estadística presentó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos pesos con un $p = 0,496$ (Tabla 1).

Tabla 1. Prueba U de Mann-Whitney para algunos parámetros de fertilidad considerados para los ratones hembras control vs grupo tratado con Cytoreg

	U de Mann-Whitney	p-valor
Peso Ovario D	29,500	,121
Peso Ovario I	49,000	,940
Peso Útero	41,000	,496

Nota: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a un Nivel de Confianza del 95%.

2. PARTE II. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA FORMULACION CYTOREG SOBRE CONDICIONES FISIOLÓGICAS DE LOS MACHOS

2.1. Peso de cada uno de los testículos de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*

En el caso de los machos, el peso del testículo derecho del grupo control fue de 0,085g mientras que el peso del testículo del grupo tratado con Cytoreg fue de 0,0891g, presentando este último un mayor peso, de igual forma al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de ambos testículos ($p = 0,762$), (Tabla 2). Para el testículo izquierdo los pesos obtenidos para cada grupo fue de 0,0793g y 0,08288g, grupo control y grupo tratado con Cytoreg respectivamente, observándose que el testículo izquierdo del grupo experimental Cytoreg tiene un peso mayor que el control sin embargo, estadísticamente no se encuentran diferencias significativas entre ambos resultados ($p > 0,05$; $p = 1$), (Tabla 2).



2.2. Peso de cada uno de los epidídimos de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*

Extraídos los epidídimos (sólo cabeza y cuerpo) derecho e izquierdo para cada uno de los grupos de ratones del ensayo, se pesaron, encontrándose que para el epidídimo derecho del grupo control se obtuvo un peso igual a 0,0199g mientras que el grupo tratado con Cytoreg 0,01885g, observándose para el epidídimo derecho del grupo control ligeramente un mayor peso, la estadística no presentó diferencias significativas entre ambos valores ($p = 0,880$). Para el peso del epidídimo izquierdo, para los ratones del grupo tratado con Cytoreg el peso fue de 0,018260g y el del grupo control fue de 0,0187g siendo mayor éste último, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p = 0,650$), (Tabla 2).

2.3. Evaluación de la movilidad espermática de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*

Otro de los parámetros de fertilidad evaluados para los ratones machos fue el tipo de movilidad que presentaban los espermatozoides de cada uno de los grupos. Los criterios usados para determinar el tipo de movilidad fueron: Movilidad Progresiva (MP), Movilidad No Progresiva (MNP) e inmóviles (I).

En el grupo control se encontró $24,4 \pm 5\%$ de espermatozoides caracterizados con un movimiento MP, mientras que el grupo Cytoreg presentó $20,2\%$; para el grupo control $55,3 \pm 6\%$ presentaron un movimiento MNP y el grupo tratado con Cytoreg un $54,7 \pm 8\%$ de espermatozoides con esta movilidad. El grupo control presentó un $31,4 \pm 6\%$ de espermatozoides inmóviles mientras que el grupo Cytoreg obtuvo un $26,1 \pm 4\%$, siendo menor con respecto al grupo control. Los resultados obtenidos para cada movilidad no presentaron diferencias estadísticamente significativas por presentar para un $p > 0,05$ se obtuvieron para MP, $p = 0,2799$; para MNP, $p = 0,1322$ y para I, $p = 0,7578$), (Tabla 2).

2.4. Concentración espermática de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*

En relación al parámetro concentración de espermatozoides (Tabla 2), el grupo control tuvo una concentración igual a $9,9 \times 10^6$ cel/mL mientras que el grupo tratado con Cytoreg obtuvo una concentración de $10,14 \times 10^6$ cel/mL, teniendo el grupo Cytoreg una mayor concentración de espermatozoides. Una vez realizado el análisis estadístico, el resultado obtenido fue que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p = 0,970$).

Tabla 2. Prueba U de Mann-Whitney para algunos parámetros de fertilidad considerados para los ratones machos control vs grupo experimental Cytoreg

	U de Mann-Whitney	p-valor
Peso TestículoD	46,000	,762
Peso Testículo I	50,000	1,000
Peso Epid D	48,000	,880
Peso Epid I	44,000	,650
MP	25,500	,064
MNP	40,500	,472
I	49,000	,940
Nº esperm	49,000	,940
Concentración	49,500	,970

Nota: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a un Nivel de Confianza del 95%.

2.5. Evaluación de la morfología de la cabeza de los espermatozoides de los ratones machos *C57BL/6//BIOU*.

Para la evaluación se detallan 200 espermatozoides por raton luego de realizar una coloración con Papanicolau y observándolos al microscopio a 100X con aceite de inmersión. En la evaluación de la morfología de la cabeza de los espermatozoides de los ratones de cada uno de los grupos, se tomaron en consideración los siguientes criterios: Normal, amorfo, banana, sin gancho y otros (Tabla 3). Para la morfología Normal el promedio en el grupo control obtuvo un valor igual a 165,9 espermatozoides mientras que el grupo tratado con Cytoreg con 151,48 células, siendo mayor el número de espermatozoides con esta morfología para el grupo control; para la morfología amorfo el promedio encontrado fue de 26,6 células para el grupo control, mientras que para el tratado fue de 37, 22. El promedio en el grupo control fue de 3,8 espermatozoides cuya cabeza presentaba la forma de banana mientras el grupo tratado Cytoreg el promedio fue de 5,55 espermatozoides. Para la morfología cabeza sin gancho el control tuvo un promedio de 3,2 células mientras que para los ratones del grupo tratado fue de 4,66 espermatozoides. Para otras morfologías el promedio fue de 0,5 para el grupo control y de 1,11 espermatozoides para el grupo de los ratones tratados con Cytoreg. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre grupos para las morfologías normal, banana, sin gancho y otros ($p = 0,07$; $p = 0,430$; $p = 0,484$ y $p = 0,152$ respectivamente). Sin embargo en el caso de la morfología Amorfo si existió diferencia significativa entre los grupos control y los grupos tratados con Cytoreg obteniéndose un valor de $p = 0,038$.

Tabla 3. Estadística de muestras independientes de la morfología de los espermatozoides.

	Grupo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	p-valor
Normal	Control	10	215,900	15,81455	5,00100	,077
	Experimental	9	201,555	17,42922	5,80974	
Amorfo	Control	10	26,6000	10,75174	3,40000	,038 (**)
	Experimental	9	37,2222	9,75676	3,25225	
Banana	Control	10	3,8000	5,05085	1,59722	,430
	Experimental	9	5,5556	4,33333	1,44444	
SinGancho	Control	10	3,2000	2,04396	,64636	,484
	Experimental	9	4,6667	6,12372	2,04124	
Otros	Control	10	,5000	,52705	,16667	,152
	Experimental	9	1,1111	1,16667	,38889	

(**) Existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

3. PARTE III. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA FORMULACION CYTOREG SOBRE CONDICIONES REPRODUCTIVAS

3.1. Número de cuerpos lúteos en cada uno de los ovarios de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

Se pudieron observar diferencias entre el número de cuerpos lúteos del ovario derecho del grupo control y el grupo tratado con Cytoreg, el control conto con una media mayor que del grupo experimental: $5,1 \pm 2,5$ y $4,1 \pm 2$ respectivamente, estas medias no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,3394$; $p > 0,05$). En relación a los promedios de cuerpos lúteos observados en los cuernos izquierdos para ambos grupos experimentales se obtuvo un promedio de $3,2 \pm 4$, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,9693$; $p > 0,05$), (Grafico 3)

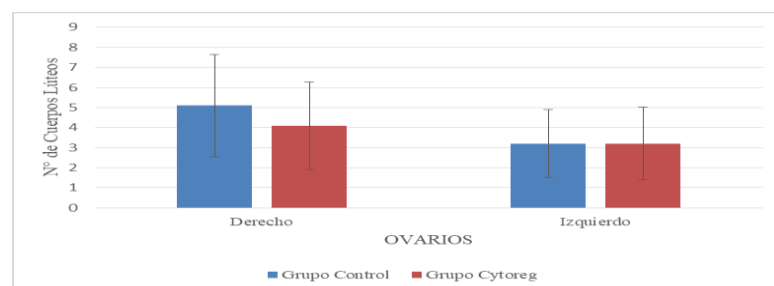




Grafico 3. Medías aritméticas del número de cuerpo lúteo de cada uno de los grupos experimentales

3.2. Cuantificación del número de embriones vivos en los grupos de ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

A los ratones hembras de cada grupo experimental se les interrumpió el tiempo de gestación, aplicando el sacrificio de las mismas a través de un método adecuado de eutanasia para determinar el número de embriones vivos, muertos así como el total de embriones que se desarrollaron.

Se observó que el número de embriones vivos para el control fue mayor que para el grupo experimental tratados con Cytoreg (con una media igual a 5,10 y 3,30) teniendo una diferencia de 1,8 unidades, sin embargo al realizar la prueba estadística dichos resultados no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,4012$; $p > 0,05$).

El número de implantaciones observadas en los cuernos uterinos indican el número de óvulos que fueron fecundados durante la copula de los animales, en relación a este parámetro, las implantaciones observadas para el grupo control en el cuerno derecho fue de 3,4 implantaciones mientras que para el grupo tratado con Cytoreg, fue de 3 implantaciones. En el cuerno izquierdo el número de implantaciones para el control fue de 2,2 y para el Cytoreg se obtuvo un valor de 2,50, al comparar los resultados obtenidos para el control y el grupo experimental Cytoreg se puede ver que las diferencias no son tan pronunciadas entre las medias. Al realizar el análisis estadístico se observó que no existen diferencias estadísticamente significativa entre el número de sitios de implantaciones en el cuerno derechos de los grupos control y el grupo tratado con Cytoreg, así como el número de implantaciones en el cuerno izquierdo entre ambos grupos experimentales ($p = 0,7841$ y $p = 0,9059$ respectivamente donde $p > 0,05$).

En el Gráfico 4, se presentan los resultados del grupo control, en este se puede observar que un 40% de animales, no se gestaron, es decir no se encontraron embriones, no presentaron gestación. Del total del 60% de las hembras gestadas, en el 10% se observó una gestación de 5 embriones, otro 10% presentaron un total de 8 embriones y otro 10% presentaron 11 embriones, y un 30% presentaron 9 embriones vivos.

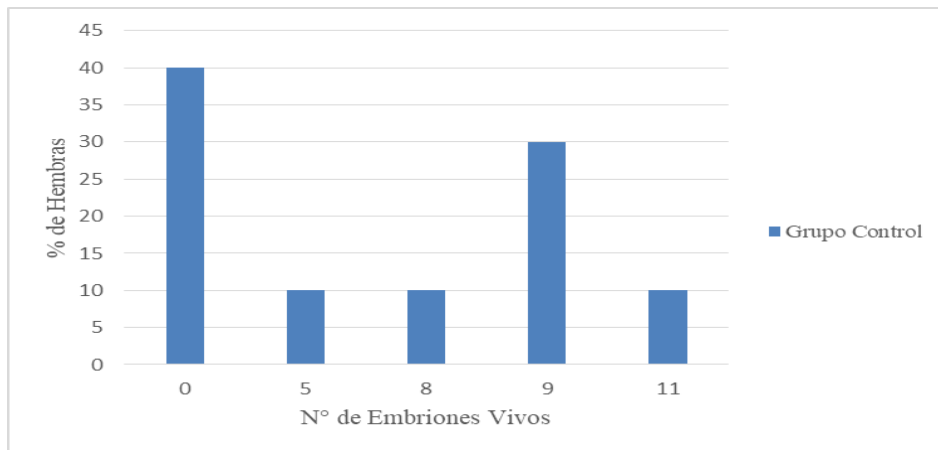


Gráfico 4. Porcentaje de ratones hembras del grupo control con un determinado número de embriones vivos

En relación a lo observado en el grupo experimental tratados Cytoreg (Gráfico 5) se observó que un 50% de animales que no se gestaron, del 50% que se gestó, un 20% de los ratones hembras presentaron nueve embriones vivos, un 20% de los animales gestaron seis embriones y un 10% gestaron 3 embriones.

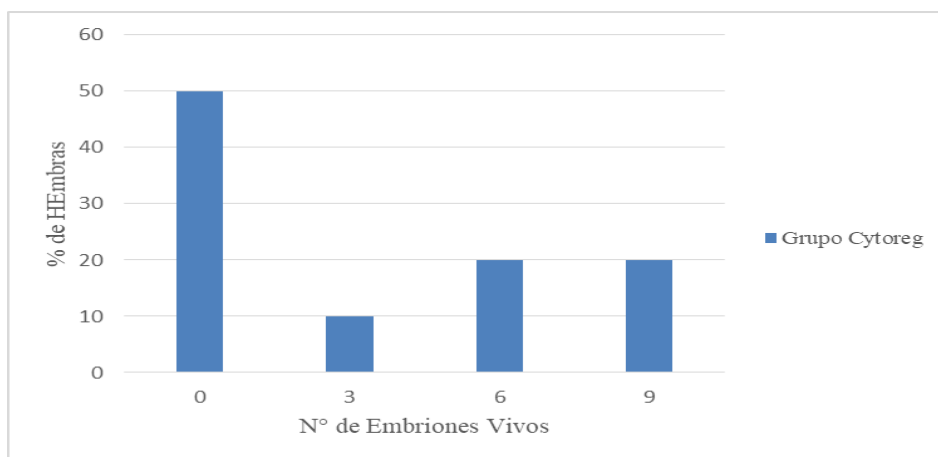


Gráfico 5. Porcentaje de ratones hembras del grupo Cytoregl con un determinado número de embriones vivos

3.3. Cuantificación del número de embriones muertos en cada uno de los cuernos uterino de los ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

En los resultados obtenidos se observó que los ratones tratados con Cytoreg presentaron una media mayor del número de embriones muertos comparados los ratones hembras del grupo control (1,20 y 0,5 respectivamente). El análisis estadístico no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,8295$; $p > 0,05$).

En relación a la frecuencia de embriones muertos, en el Gráfico 6 se puede observar el 30% de las hembras del grupo control tuvieron un embrión muerto y sólo un 10% de las

hembras tuvieron dos embriones muertos. El 60% de las hembras no presentaron embriones muertos.

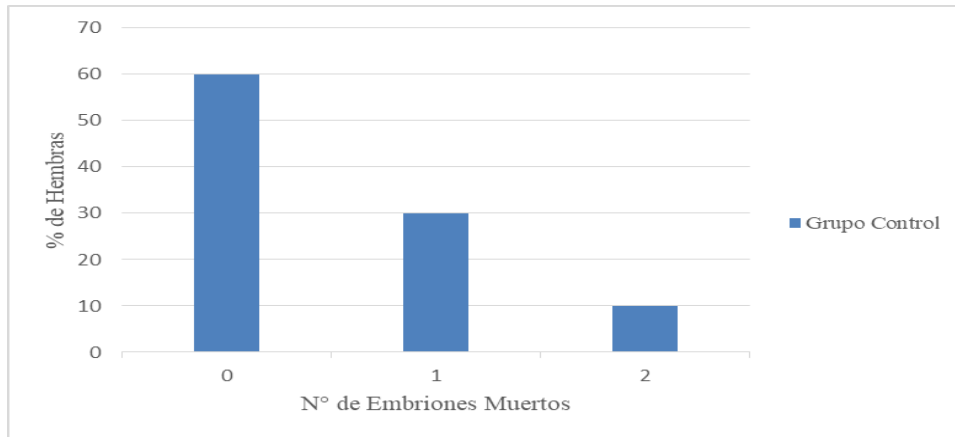


Gráfico 6. Porcentaje de ratones hembras del grupo control con un determinado número de embriones muertos

En relación al grupo tratado con Cytoreg (Gráfico 7) el 10% de las hembras presentaron un total de siete embriones muertos, un 20% de los animales tuvieron un embrión muerto, y sólo un 10% perdió tres embriones. Ambos grupos tuvieron en común que el 60% de los animales no tuvieron muerte de embriones.

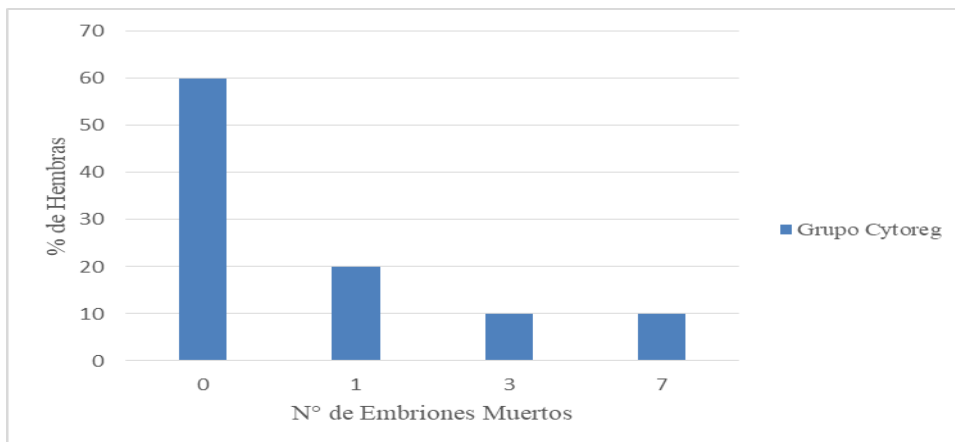


Gráfico 7. Porcentaje de ratones hembras del grupo Cytoreg con un determinado número de embriones muertos

3.4. Cuantificación del número de embriones vivos en los grupos de ratones hembras *C57BL/6//BIOU*

En general, el total de embriones para cada grupo (vivos y muertos) fue de 56 embriones para el control y 45 embriones para el grupo experimental Cytoreg, donde para ambos grupos cuatro animales no quedaron gestadas. Siendo el promedio total por hembra de $5,6 \pm 1$ y de $5,5 \pm 4$ para el grupo control y para el grupo tratado con Cytoreg respectivamente.

En la Tabla 4 se puede observar un resumen de los resultados relacionados con la estadística del grupo de parámetros de la fertilidad de los ratones hembras del grupo control y grupo experimental o tratado con Cytoreg.

Tabla 4. Media del número de cuerpos lúteos, número de embriones vivos, número de embriones muertos, número total de embriones y número de sitios de implantación de los grupos experimentales.

	Grupo							
	Control				Experimental			
	Medi a	Error típ. de la media	Median a	Desv. típ.	Media	Error típ. de la media	Mediana	Des v. típ.
N_CuerposLCD	5,10	,809	5,50	2,558	4,10	,690	4,50	2,183
N_CuerposLCI	3,20	,533	4,00	1,687	3,20	,573	3,00	1,814
N_Embiones Vivos	5,10	1,464	6,50	4,630	3,30	1,221	1,50	3,860
N_Embriones Muertos	,50	,224	,00	,707	1,20	,712	,00	2,251
N_TotalEmbriones	5,60	1,579	7,50	4,993	5,50	1,544	7,50	4,882
N_SitiosImplantacion esD	3,40	1,166	2,50	3,688	3,00	,931	3,00	2,944
N_SitiosImplantacion esI	2,40	,702	3,00	2,221	2,50	,764	2,50	2,415

Conclusion general.

En el ensayo realizado no se observaron diferencias significativas entre los resultados de los grupos control y los grupos experimentales tratados con Cytoreg.

