



CAPACIDAD EMBRIONARIA Y CALIDAD SEMINAL
EN RATONES SELECCIONADOS POR PESO

SANDRA FABIANA BERNARDI

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Directora: Dra. María Inés Oyarzabal
Codirector: M. Sc. Guillermo Brogliatti

A Juan José y Valentina

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

a mis Compañeros de trabajo y Amigos

Lic. Carolina Herrera

Dr. Jorge Sztein

Centro Genético Bovino EOLIA S.A.

SYNTEX S.A. Industria Bioquímica & Farmacéutica

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Relación entre reproducción y selección de caracteres productivos	3
1.2. Tecnologías de reproducción asistida	7
1.3. Indicadores reproductivos en el ratón	11
1.4. Caracteres reproductivos en ratones seleccionados por peso en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario	13
2. Objetivos	16
3. Materiales y métodos	18
3.1. Líneas seleccionadas de ratones	18
3.2. Caracteres de fertilidad en hembras	22
3.2.1. Grupos experimentales	22
3.2.2. Variables estudiadas	24
3.2.3. Diferencias de caracteres de fertilidad	24
3.2.4. Diferencias de caracteres de fertilidad en hembras con estimulación ovárica	26
3.2.5. Efectos de la selección y de la estimulación ovárica	26
3.3. Caracteres de fertilidad en machos	28
3.3.1. Peso y estructura testicular	28
3.3.2. Concentración espermática y porcentaje de células anormales	28
3.3.3. Motilidad, progresividad y vigor de los espermatozoides...	31
3.3.4. Variables estudiadas	33
3.3.5. Análisis realizados	36

4. Resultados	37
4.1. Caracteres de fertilidad en hembras	37
4.1.1. Diferencias entre ambos lados del tracto reproductivo ...	37
4.1.2. Relación de la fertilidad con el peso corporal	38
4.1.3. Eficiencia reproductiva de las líneas	43
4.2. Caracteres de fertilidad en hembras con estimulación ovárica ...	44
4.2.1. Diferencias entre ambos lados del tracto reproductivo	44
4.2.2. Relación de la fertilidad con el peso corporal	45
4.2.3. Eficiencia reproductiva de las líneas	48
4.2.4. Efectos de la selección y de la estimulación ovárica	50
4.3. Caracteres de fertilidad en machos	52
4.3.1. Peso y estructura testicular	52
4.3.2. Concentración espermática y porcentaje de células anormales	55
4.3.3. Motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides	56
5. Discusión	58
6. Bibliografía	72
7. Anexos	82
7.1. Anexo I	82
7.2. Anexo II	99

INDICE DE CUADROS

I	Promedios y errores estándar del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación del lado izquierdo y del lado derecho del tracto reproductivo en tres líneas de ratones	38
II	Promedios y errores estándar de peso, del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y del tamaño de camada en tres líneas de ratones	41
III	Tasas del número de cuerpos lúteos, embriones, sitios de implantación y tamaño de camada sobre el peso en tres líneas de ratones.....	42
IV	Promedios y errores estándar del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación del lado izquierdo y del lado derecho del tracto reproductivo en tres líneas de ratones. Hembras con estimulación ovárica	45
V	Promedios y errores estándar de peso, del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y del tamaño de camada en tres líneas de ratones. Hembras con estimulación ovárica	46
VI	Tasas del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y del tamaño de camada sobre peso en tres líneas de ratones. Hembras con estimulación ovárica	48
VII	Significado de los efectos de la selección y del tratamiento sobre el número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada.....	50
VIII	Incremento relativo del número de cuerpos lúteos, embriones, y sitios de implantación, y del tamaño de camada en tres líneas de ratones	51
IX	Coefficientes de variación de peso, del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y del tamaño de camada por línea. Hembras estimuladas y no estimuladas	52
X	Promedios y errores estándar de peso, peso de testículos, diámetro del túbulo seminífero y espesor del epitelio seminífero en tres líneas de ratones	53

XI	Coeficientes de regresión del peso testicular en el peso corporal y del diámetro de los túbulos seminíferos y del espesor del epitelio en el peso de los testículos en tres líneas de ratones	55
XII	Promedios y errores estándar del número de espermatozoides y del porcentaje de células anormales en tres líneas de ratones	56
XIII	Promedios y errores estándar de parámetros de motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides (Parámetros CASA) en tres líneas de ratones	57

INDICE DE FIGURAS

1	Ratones hembras seleccionados por peso corporal	19
2	Ratones machos seleccionados por peso corporal	19
3	Evolución del peso medio de hembras	21
4	Evolución del peso medio de machos	21
5	Microfotografías ópticas de testículo teñidas con hematoxilina y eosina	29
6	Cámara de Neubauer. Recuento de espermatozoides	31
7	Microfotografía óptica del espermatozoide de ratón (1000X).....	32
8	Razones entre las velocidades de los espermatozoides	35
9	Ovarios y oviductos de ratones seleccionados por peso	40
10	Regresión del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada en peso	42
11	Pérdidas totales y por etapas de la gestación por línea	44
12	Regresión del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada en peso. Hembras con estimulación ovárica	47
13	Pérdida total y por etapas de la gestación por línea. Hembras con estimulación ovárica	49
14	Testículos, epidídimos y conductos deferentes de ratones seleccionados por peso	54

Resumen

En animales de interés económico es difícil evaluar los efectos a largo plazo de la selección genética de caracteres productivos sobre la reproducción, una alternativa es la utilización de modelos experimentales con animales de laboratorio. La selección de peso a los 49 días de edad practicada por casi 50 generaciones en un par de líneas de selección divergente, originadas a partir de una población t de ratones de la cepa CF1, ocasionó diferencias en caracteres relacionados con fertilidad (número y tamaño de folículos ováricos, edad a la pubertad, intervalo entre partos, longitud de vida reproductiva). Con el objetivo de probar si la selección de peso modificó la capacidad embrionaria de las hembras de estas líneas y la capacidad reproductiva de los machos, y si la superovulación puede mejorar la fertilidad, se propuso: evaluar las tasas ovulatorias y las pérdidas gestacionales en tres etapas de la gestación en hembras de las tres líneas con y sin estimulación ovárica, y se comparó el peso de los testículos, la estructura del túbulo seminífero y la calidad seminal de los machos de las tres líneas. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la selección artificial de peso modificó la capacidad ovulatoria y uterina de estas líneas, como también, las estrategias de selección natural en cuanto a los momentos en que se producen las mayores pérdidas gestacionales. Además se observó un comportamiento diferenciado en las hembras, en cuanto al momento en que ocurre la mayor proporción de mortalidad, según

estén o no superovuladas. Las hembras de la línea no seleccionada, tanto para el grupo control como para el grupo con estimulación ovárica, tuvieron una mejor *performance* reproductiva. Con una posición intermedia en cuanto al número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, llegaron a parir un número mayor de crías debido a un menor porcentaje de mortalidad embrionaria, todo esto con un peso intermedio entre las líneas seleccionadas y con menores coeficientes de variación haciéndolas más estable y por lo tanto más predecible. Los machos de las tres líneas se diferenciaron significativamente en el mismo sentido de la selección, para peso testicular, espesor del túbulo seminífero y concentración espermática, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas para los parámetros que dieron cuenta de la motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Relación entre reproducción y selección de caracteres productivos

En los establecimientos pecuarios, un buen nivel de producción y una reproducción eficiente son indispensables para el logro de los objetivos productivos y económicos. El incremento del nivel de producción por selección artificial de caracteres de interés económico no siempre está acompañado por buenos indicadores reproductivos. Esta relación entre la *performance* reproductiva y la respuesta a la selección de caracteres productivos, fue tratada por numerosos autores en diversas especies con resultados diferentes.

En conejos, bovinos lecheros, ovejas, perros y ratones, Brien (1986) revisó trabajos donde se describen relaciones fenotípicas y genéticas, generalmente, positivas entre caracteres reproductivos y caracteres de crecimiento y peso corporal.

Otros trabajos más recientes, dan cuenta de una tendencia hacia una relación negativa entre caracteres reproductivos y productivos, estos últimos seleccionados artificialmente, lo cual podría atribuirse a que las relaciones negativas se expresan en el largo plazo luego de una selección artificial continua.

Rauw y col. (1998), a partir de una revisión de trabajos en pollos parrilleros, pavos, bovinos lecheros y cerdos, pusieron de manifiesto relaciones generalmente

negativas. Entre otros ejemplos, mencionaron una reducción de la fertilidad, un mayor porcentaje de huevos defectuosos (doble yema, extracalcificados, cáscara blanda), una menor relación entre el porcentaje de producción diaria de huevos normales y el porcentaje de ovulaciones diarias, y una mayor frecuencia de cromosomas anormales en los embriones, cuando se realizó selección para alta tasa de crecimiento o alto peso corporal, en pollos parrilleros y en pavos. Los autores también revisaron trabajos que relacionan las características del semen con los efectos de la selección para alto peso registrándose, en algunos casos, concentraciones, volumen y motilidad del semen más bajas, conjuntamente con un mayor porcentaje de espermatozoides muertos o anormales, en pavos seleccionados para alto peso con respecto a los de una línea seleccionada para bajo peso. En bovinos, se ha observado una relación antagónica entre caracteres de fertilidad y producción de leche; estros prolongados, mayor número de servicios por concepción, demoras en lograr la preñez, intervalos entre pariciones más largos y una menor tasa de retorno a los 56 días, se asociaron con alta producción de leche. En coincidencia con los resultados mostrados en esta revisión, la relación negativa entre caracteres de fertilidad y alta producción de leche también fue tratada, entre otros, por Oltenacu y col. (1990), Royal y col. (2000), Lucy (2001), Marini y Oyarzabal (2002).

En especies politocas, particularmente en cerdos, Rauw y col. (1998), expusieron resultados de trabajos que demuestran una reducción en el tamaño de camada en una línea seleccionada para alta conversión de alimento en carne magra y en otra de bajo consumo diario de alimento al compararlas con sus respectivas líneas control. Hermes y col. (2000) demostraron que existe una correlación

genética negativa, particularmente alta, entre tamaño de camada y tasa de crecimiento y consumo. El intervalo destete-concepción fue superior en los individuos con valores reproductivos mayores para ganancia de peso (Ten Napel, 1997).

En conejos destinados a la producción de carne, es frecuente observar la práctica de la selección para alta tasa de crecimiento, con el objetivo de disminuir el tiempo para alcanzar el peso de faena. O bien, se introduce una raza de gran porte para que a través de cruzamientos se mejoren los pesos de los animales del conejar. Ambas estrategias mostraron efectos negativos en la productividad, puesto que los animales requirieron más tiempo para llegar a la madurez y la fertilidad se vió disminuida al observarse un menor número de crías destetadas por hembra (Antonini, 2007).

En una revisión, Rydhmer y col. (2000) señalaron que las relaciones desfavorables entre caracteres reproductivos y productivos en distintas especies, justifican la necesidad de incluir a los primeros en los planes de selección para mejorar la sustentabilidad de la cría animal.

Los largos intervalos generacionales y los elevados costos de mantenimiento provocan que los experimentos con animales de interés económico sean difíciles de llevar a cabo. Es así, que los animales de laboratorio se utilizan como modelos experimentales en producción y mejoramiento genético animal. La evaluación de las características reproductivas de hembras y machos y su relación con la selección artificial no escapan a lo dicho, es más fácil observarlas en animales de laboratorio

teniendo en cuenta que pueden expresarse en el largo plazo después de procesos selectivos continuos.

Fowler y Edwards (1960) en ratones seleccionados por peso corporal evaluaron diversos caracteres de fertilidad. La mayor tasa de ovulación y un mayor intervalo servicio-parición correspondieron a las hembras más pesadas, y un aumento de la esterilidad acompañó a un incremento de la tasa de crecimiento debido, probablemente, a la menor libido de los machos más pesados.

Roberts (1961) observó una reducción significativa en la longitud de la vida reproductiva de ratones, acompañada por intervalos entre partos más largos, menor número de crías paridas y de crías destetadas a lo largo de la vida, igual que los gramos totales destetados por hembra, si comparaba a las hembras seleccionadas para alto peso con las hembras de bajo peso y con las de la línea control. El mismo autor, en una revisión realizada en 1965 sobre las contribuciones del ratón de laboratorio a la cría animal, analizó trabajos donde se comprobó que la tasa de ovulación, el tamaño de camada y la longitud de vida productiva se modificaron como consecuencia de la selección por peso corporal.

Land (1970) comunicó una correlación genética positiva entre el número de oocitos ovulados y el peso corporal, y demostró una relación entre el peso y la actividad de la hormona folículo estimulante y la sensibilidad del ovario a dicha hormona.

Bradford (1971) en ratones seleccionados para rápida ganancia de peso observó que la práctica de la selección realizada diferenció a las líneas en su

capacidad maternal, siendo la línea de selección negativa la que sufrió el mayor deterioro en las características reproductivas observadas.

En la revisión de Brien (1986), se citan trabajos en los cuales el tamaño de camada se modificó en función de la dirección de la selección por crecimiento, se redujo la longitud de la vida reproductiva, la infertilidad pudo ocurrir a edades tempranas y se observó una disminución en la libido del macho relacionada con problemas de infertilidad, cuando se seleccionó para alto peso.

En dos líneas endocriadas de ratones, Domenichini y col. (1989) demostraron una pérdida de fertilidad y de sobrevivencia como consecuencia de la respuesta significativa a la selección divergente de peso practicada en estas líneas.

Una relación antagónica entre aptitud y crecimiento se observó en dos líneas de selección divergente a largo plazo para depósito de proteínas, en ellas el número total de descendientes varió en forma positiva y lineal con el peso libre de grasa (von Barkemeyer y col., 1989).

Bünger y col. (1992) encontraron que el tamaño de camada se redujo al seleccionar ratones para mayor peso corporal a los 42 días de edad en una población no endocriada.

1.2. Tecnologías de reproducción asistida

Desde mediados del siglo XX se desarrollaron tecnologías asociadas a la reproducción, que incluyen desde la inseminación artificial pasando por la congelación del semen, la sincronización e inducción de la ovulación, la

superovulación, la transferencia y congelación de embriones, la determinación y selección del sexo de espermatozoides y embriones, la producción *in vitro* de embriones, hasta la clonación. La superovulación y la transferencia embrionaria, en algunas especies de animales domésticos como los bovinos, alcanzaron su máximo desarrollo a comienzos de 1980 y actualmente cuentan con una generación anual de 500.000 embriones transferidos, de ellos casi una cuarta parte en Sudamérica según las estadísticas del año 2005 (Palma, 2008a).

En la superovulación, generalmente, se administran por vía exógena dos hormonas, gonadotrofina coriónica equina (eCG), anteriormente llamada gonadotrofina de suero de yegua preñada (PMSG) y gonadotrofina coriónica humana (hCG), pudiendo ser utilizadas por separado o en forma conjunta (Videla Dorna y Wüst, 1998; Solorio López y col., 2002). La hCG posee acción biológica luteinizante (LH), por lo cual induce la ovulación y la formación del cuerpo lúteo en la mayoría de las especies domésticas. Esta acción permite el uso de la hCG con el objetivo de sincronizar la ovulación en animales cíclicos, o de estimular el desarrollo del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona en animales que lo requieran. La acción biológica de la eCG es compatible con la hormona folículo estimulante (FSH), por lo que se utiliza para inducir al ovario a múltiples ovulaciones y así aumentar el número de óvulos, es decir, el número de potenciales embriones (Benavides y Guénet, 2003).

En animales con ovulaciones múltiples, la superovulación no necesariamente está asociada a la transferencia de embriones como lo es en bovinos y equinos. En esos casos se puede aplicar para aumentar aún más el número de oocitos ovulados,

esperando que, además, el tratamiento incrementa proporcionalmente el número de crías paridas por parto. Day y col. (1967) evaluaron la fertilidad de un grupo de cerdas luego de haberlas superovulado con gonadotrofinas y demostraron un incremento en la tasa de ovulación y en el tamaño de camada promedio a los 25 días posteriores al apareamiento. En cerdas nulíparas ciclantes las gonadotrofinas mejoraron el tiempo del ingreso de las hembras a servicio. Los celos inducidos tuvieron una fertilidad similar a la de los celos naturales y en hembras múltiparas el uso de estas hormonas redujo el intervalo destete-servicio y mejoró el porcentaje de retención de servicio. No hubo diferencias en el número de lechones nacidos ni en el peso al nacimiento, es decir, el tratamiento no tuvo efectos sobre el tamaño de camada. Fuentes Cintra y col. (2006) observaron que la administración de gonadotrofinas en cerdas primerizas permitió sincronizar el celo y reducir el intervalo al estro pero no encontraron diferencias para tasa de parto y tamaño de camada al nacimiento y al destete.

Al mismo tiempo en que se hizo frecuente el uso de las gonadotrofinas exógenas con el fin de provocar la superovulación, se demostraron algunos efectos adversos que esta técnica ocasiona sobre el desarrollo embrionario de diversos mamíferos. Si bien es una tecnología altamente efectiva para incrementar la tasa de ovulación y el número de embriones, provoca un incremento de la mortalidad embrionaria y disminuye la tasa de implantación, fundamentalmente, por una pérdida de la calidad del embrión y/o por un deterioro de la receptividad del endometrio. Miller y col. (1981) al superovular ratas de 30 días de edad con distintas dosis de gonadotropina (eCG) observaron desmejoras e interrupciones en el desarrollo normal de la gestación al compararlas con las hembras control. El uso de eCG

resultó en un incremento del número de oocitos maduros y de embriones pero el peso de los fetos implantados fue decreciendo significativamente con el avance de la gestación hasta comprometer su viabilidad para llegar al término de la preñez. Tain y col. (2000) al estudiar en ratas los efectos de la hiperestimulación con gonadotrofinas y el efecto de la edad de las hembras sobre los oocitos y su capacidad para entrar en metafase II, obtuvieron resultados que les permitieron descartar la hipótesis de que la estimulación hormonal de los ovarios en combinación con la edad conduciría a una mayor proporción de anormalidad en los óvulos con respecto al comienzo inapropiado de la metafase de la segunda división meiótica.

McKiernan y col. (1998) observaron en hamster estimulados con gonadotrofinas, que un porcentaje significativamente mayor de embriones permanecían en el estadio de una sola célula, es decir, detenían o demoraban su desarrollo, y que el promedio de embriones con desarrollo normal a las 82 horas posteriores a la fecundación resultó significativamente menor al de las hembras control. En el período posterior a la implantación se encontró una reducción significativa del porcentaje de fetos viables en las hembras estimuladas con respecto a las hembras control. Estos resultados permitieron concluir que la viabilidad reducida de los embriones, posiblemente, estuvo relacionada con anormalidades cromosómicas y al tener un menor número de células no lograron efectivizar una adecuada implantación aumentando el porcentaje de mortalidad.

Elmazar y col. (1989) observó en ratones superovulados un incremento de la tasa de apareamiento y del número de sitios de implantación, acompañado por un aumento de la mortalidad durante la gestación.

1.3. Indicadores reproductivos en el ratón

El número de oocitos ovulados por ciclo estral (*tasa de ovulación*) juega el papel más preponderante en la determinación de la *performance* reproductiva por marcar el límite superior del número de crías al nacimiento (Spearow y col., 1999b). Un buen *tamaño de camada*, además de la disponibilidad de oocitos y *embriones* viables supone una adecuada *capacidad embrionaria*, característica que le permitirá a cada hembra llevar a término a la mayor cantidad de *fetos implantados*. Razón por la cual, tanto o más importante que el número de oocitos disponibles en los oviductos, es una baja ocurrencia de *pérdidas gestacionales*.

En el ratón adulto, la espermatogénesis tiene una duración de 34 a 35 días y se desarrolla en los *túbulos seminíferos* presentes en un número de 15 a 20 y con una longitud total de 2 metros, constituyendo la base estructural de cada testículo. Las células germinales forman la pared de dichos túbulos y se encuentran altamente organizadas conformando el *epitelio seminífero* (Guzmán y col., 2005). Para que un macho sea considerado fértil deberá producir espermatozoides maduros en una concentración correcta para su especie, con una estructura normal y con una capacidad motora adecuada (Buxadé Carbó y col., 1995).

Miles de millones de espermatozoides son depositados en el tracto genital de la hembra durante la cópula. Desde allí y hasta llegar a la ampolla, lugar del oviducto

donde se realiza la fecundación, estos gametos deben superar diversas barreras anatómicas y fisiológicas y mientras tanto sufrirán cambios bioquímicos y metabólicos. Estas barreras tienen que ver con el proceso de eliminación selectiva de las células espermáticas, el cual no sólo se limita a las anomalías en la morfología o en la incapacidad de movimiento, sino que fundamentalmente se basa en el éxito o fracaso de los procesos bioquímicos, biofísicos y metabólicos necesarios para que los espermatozoides adquieran la capacidad de fecundar. Una baja tasa de fertilización puede estar asociada a anomalías estructurales de las células o también puede estar en relación a alteraciones en su motilidad (Stachecki y col., 1993). Tanto el **número de espermatozoides** como la presencia de **células anormales** son fáciles de determinar mediante métodos manuales de rutina; en cambio, evaluar la motilidad se vuelve más dificultoso. Por ello, actualmente el estudio del movimiento de los espermatozoides puede realizarse mediante análisis computarizado (CASA: Computer Assisted Sperm Analysis) otorgando objetividad, exactitud y eficiencia a la evaluación de la **calidad seminal**, fundamentalmente, a través de patrones de **motilidad del esperma** (Kato y col., 2001). Sin embargo, la información obtenida del análisis puede verse afectada por diversos factores, como condiciones de la muestra (método de obtención de la muestra de semen, temperatura, diluyente, concentración), o condiciones referidas al sistema (microscopio, sistema de video, número de campos analizados). Sólo cuando todos los factores están bajo control el análisis puede considerarse satisfactorio. Por otra parte, los espermatozoides no siempre presentan la misma velocidad y dirección de movimiento, por ello para evitar resultados equívocos también debe considerarse la repetitividad del análisis en diversos campos por muestra (Palma, 2008b).

1.4. Caracteres reproductivos en ratones seleccionados por peso en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario

En la Facultad de Ciencias Veterinarias (U.N.R.), a partir de una población (**t**) de ratones de la cepa CF1, no seleccionada y con apareamientos al azar, se fundó un par de líneas de selección divergente para peso a los 49 días de edad (**s**⁺: seleccionada para alto peso; **s**: seleccionada para bajo peso), con animales pertenecientes a la generación 3 de **t**.

Las líneas seleccionadas comenzaron a diferenciarse desde la generación 8. La respuesta a la selección divergente se comprobó en las diferencias significativas encontradas entre ambas líneas, para los pesos promedios por generación, en hembras y en machos (Oyarzabal y Rabasa, 1995). La selección de peso permitió obtener animales individualmente más pesados o más livianos según el sentido de la selección, es decir, producir más o menos gramos por individuo. Pero cuando se analizó la eficiencia de producción a nivel poblacional, se comprobó que la línea no seleccionada (**t**) produjo más gramos por gramo mantenido en servicio, debido a un mayor porcentaje de pariciones y a una mayor fertilidad (Oyarzabal, 2003).

Paralelamente, se observó un deterioro de la aptitud biológica en las líneas seleccionadas desde generaciones tempranas, con modificaciones importantes ocurridas en otros caracteres que tienen que ver con la fecundidad, la fertilidad y la sobrevivencia, los cuales no fueron seleccionados. Fue frecuente, en indicadores tales como coeficiente de fertilidad, coeficiente de supervivencia al destete, porcentaje de pariciones y coeficiente de aptitud, que los promedios de **t** superaran a los de las líneas seleccionadas por peso, y que la variabilidad de **t** fuera menor que las de **s** y

s'. Los menores promedios y las mayores oscilaciones a lo largo de las generaciones de **s** y **s'** indicaron menor aptitud y menor estabilidad de las líneas seleccionadas con respecto a la población no seleccionada (**t**), compuesta por animales de peso intermedio (Oyarzabal y Rabasa, 1999).

El seguimiento de los 220 días posteriores al primer estro, evidenció que las hembras de la línea **t** superaron a las de las seleccionadas en el número de pariciones y en el número de crías, y tuvieron menores intervalos interpartos. Todo esto, implicó que una hembra **t** produjera a lo largo de su vida reproductiva más gramos aún que **s'**, línea de animales más pesados. Finalmente, si se considera la producción en gramos por hembra de la línea **t** como 100%, cada hembra **s'** produjo en 220 días el equivalente al 82% de una **t**, y cada hembra **s** el 43%. Lo cual significa que para alcanzar la misma producción que una hembra **t**, se necesitarían 1,2 hembras **s'** o 2,3 hembras **s** (Bernardi y col., 1999).

La selección practicada también modificó otros caracteres relacionados con la fertilidad, como la edad a la apertura vaginal asociada al primer estro y, por lo tanto, indicativa de la llegada a la pubertad. Los resultados obtenidos mostraron que en la línea seleccionada para alto peso se produjo un adelantamiento de la madurez sexual y que en la seleccionada para bajo peso hubo hembras precoces y otras de madurez tardía. La duración del ciclo estral fue de 3 a 4 días en las tres líneas de ratones, debiéndose esta variación a diferencias en la fase diéstrica (proestro: 12 horas; estro: 24 horas; metaestro: 6 horas; diestro: de 24 a 48 horas) (Bernardi y col., 1999).

La comparación de la estructura y capacidad ovárica de las hembras de estas líneas mostró que el desarrollo de los folículos ováricos y la tasa de ovulación se modificaron en el mismo sentido de la selección de peso. De tal manera que las hembras de la línea de alto peso contaron con un número mayor de folículos, con un mayor porcentaje de folículos grandes desde edades más tempranas y con un mayor número de cuerpos lúteos (Bernardi y col., 2007). Debido a la relación de los resultados descritos anteriormente con el presente trabajo, el artículo mencionado se adjunta en el Anexo I.

2. Objetivos

La fertilidad, como un proceso complejo, depende de un sinnúmero de factores que afectan a la capacidad reproductiva de machos y hembras, entre otros, la búsqueda de un aumento de la producción por selección artificial a largo plazo y la aplicación de nuevas tecnologías reproductivas. Los antecedentes señalados en los trabajos realizados en dos líneas de ratones de selección divergente para peso corporal y en una no seleccionada, referidos a los efectos de la selección artificial sobre la estructura ovárica y la prolificidad, permiten suponer que en éstas líneas, el potencial reproductivo y las pérdidas gestacionales difieren como consecuencia de la selección realizada, desconociéndose el efecto conjunto de la selección y la estimulación ovárica en la capacidad embrionaria y en el tamaño de camada, como una de las principales componentes de la aptitud biológica. La contribución del macho, en cuanto a su capacidad reproductiva y a la calidad de su semen, es otro de los factores a tener en cuenta para explicar la reproducción de las líneas seleccionadas por peso.

Para lo cual, se proponen los siguientes objetivos:

Comparar la capacidad embrionaria de las hembras de estas líneas mediante el análisis de su potencial reproductivo y de las pérdidas embrionarias en distintas fases de la gestación.

Probar si la estimulación ovárica modifica la capacidad embrionaria hasta la primera parición.

Comparar el peso de los testículos, la estructura de los túbulos seminíferos y la calidad seminal de los machos de estas líneas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Líneas seleccionadas de ratones

La cepa CF1 proviene de una población de ratones albinos no suizos obtenidos en 1935 en Estados Unidos, endocriados durante 20 generaciones. En la generación 21 fueron reducidos a una sola pareja de la cual descienden todos los animales CF1 (Chia y col., 2005). Desde ese momento no tuvieron lugar más apareamientos consanguíneos, transcurriendo alrededor de 90 generaciones hasta que se fundaron las líneas que se utilizaron en el presente trabajo.

En 1986, a partir de una población de ratones de la cepa CF1 existente en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.R., se formó primero una población testigo (**t**) no seleccionada con apareamientos al azar. Posteriormente, con animales de la generación 3 de **t**, se fundó un par de líneas de selección divergente para peso corporal a los 49 días de edad (Oyarzabal y Rabasa, 1995; 1999), **s'**: línea de selección positiva y **s**: línea de selección negativa.

La selección por peso se realizó eligiendo como reproductores los animales de pesos más extremos (los más pesados en **s'** y los más livianos en **s**) y de buen aspecto general (Fig. 1 y 2).

Fig. 1. Ratones hembras seleccionados por peso corporal



Fig. 2. Ratones machos seleccionados por peso corporal



Se registró el peso a los 49 días de edad de todos los animales desde el origen de las líneas, las genealogías y las historias reproductivas de las hembras que fueron seleccionadas. En las Fig. 3 y 4 se observan las evoluciones del peso medio de hembras y machos a lo largo de las generaciones. La línea positiva y su correspondiente negativa difirieron significativamente desde la generación 8, contadas desde su origen. En las generaciones 18 a 20, se produjo un aumento en el peso de *t* y en el de las líneas seleccionadas en ambos sexos, recién en las generaciones 22-23 se evidenció un descenso del peso de *s*. En las últimas generaciones, las hembras de la línea *s'* tienen pesos aproximadamente un 20% superior al promedio de las de *t*, y las de *s* son un 16% más livianas que aquellas; ésto hace una diferencia de peso del 36% entre las hembras *s* y *s'*. En machos, la diferencia es de alrededor del 16% al relacionar las líneas seleccionadas con la testigo; y de aproximadamente 32% entre los individuos más livianos y más pesados.

El pequeño tamaño poblacional de estas líneas produjo endocría por limitación del número, alcanzándose para *t* y el par *s* valores del coeficiente de endocría: $F \cong 0.47$ y $F \cong 0.90$, respectivamente, en las generaciones a las que pertenecieron los animales utilizados, suponiendo un $F=0$ en los animales fundadores.

En todas las líneas los planteles son monogámicos, se realizan simultáneamente y no existe superposición de generaciones. Se les suministra *ad-libitum* agua y un alimento comercial para ratones.

Fig. 3. Evolución del peso medio de hembras

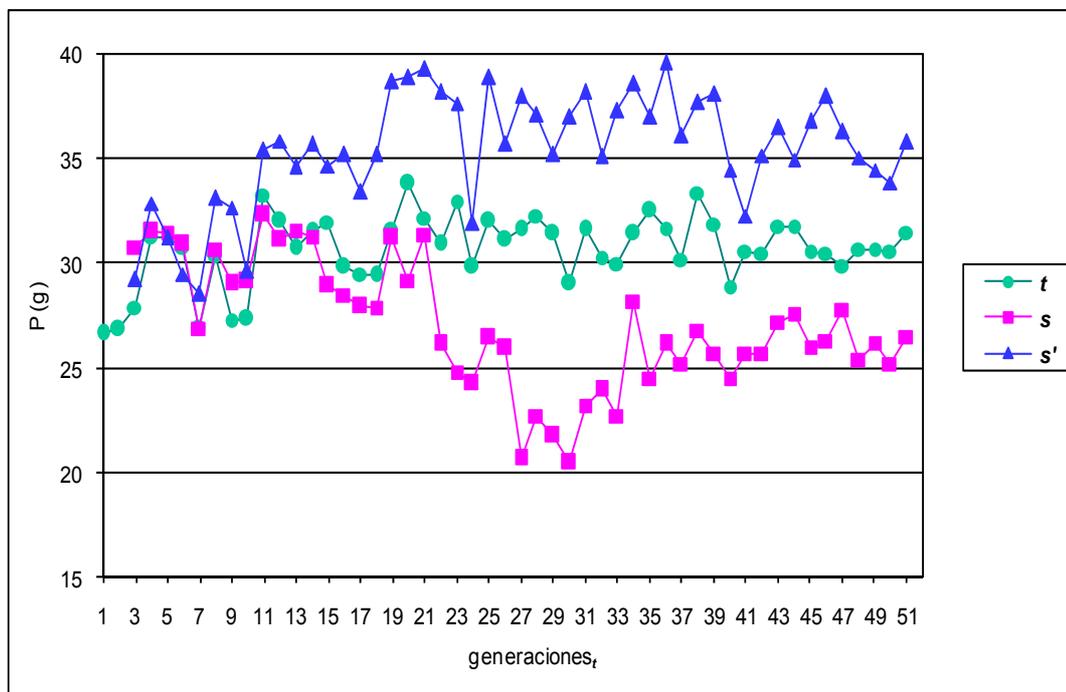
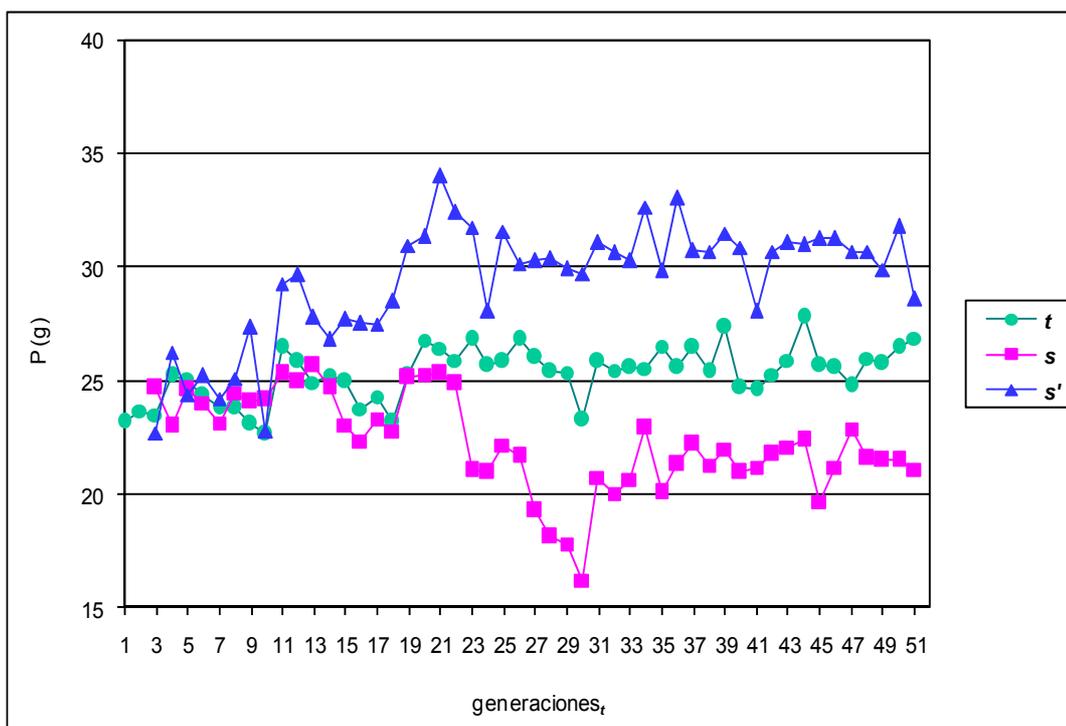


Fig. 4. Evolución del peso medio de machos



El manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo con normas éticas pautadas en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Institute of laboratory animal resources, 1996). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical (AVMA, 2007).

3.2. Caracteres de fertilidad en hembras

3.2.1. Grupos experimentales

Para comparar la capacidad embrionaria de las hembras, con y sin estimulación ovárica, se eligieron al azar 72 hembras adultas jóvenes (50 a 80 días de edad) de cada una de las tres líneas (**t**, **s** y **s'**). Dado que las líneas no comenzaron simultáneamente, las hembras utilizadas pertenecieron a las generaciones: 47 a 50 de **t** y 44 a 48 del par **s**. Se las dividió en dos grupos: **A** y **B**, y el procedimiento llevado a cabo para las hembras de cada grupo fue el siguiente:

Grupo A: constituido por 27 hembras a las cuales, cuando se detectó que estuvieran en estro mediante citología vaginal exfoliativa (Feldman y Nelson, 1996), se les dio servicio en proporción 1♀:1♂ durante 24 horas; luego se evaluó la presencia del tapón vaginal y:

A1) 9 de ellas se sacrificaron entre las 56 y 72 horas posteriores al servicio,

A2) otras 9 hembras se sacrificaron a los 7 días posteriores al servicio,

A3) las restantes 9 permanecieron hasta la primera parición.

Grupo B: con el fin de sincronizar el estro y estimular la ovulación, a las restantes 45 hembras se les administraron por inyección intraperitoneal, 5UI de eCG (Novormon®, Laboratorios Syntex S.A. Argentina) y 48 horas más tarde 5 UI de hCG (Novormon®, Laboratorios Syntex S.A. Argentina). Al momento de recibir la dosis de hCG, se les dio servicio en proporción 1♀:1♂ durante 24 horas; luego se evaluó la presencia del tapón vaginal y:

B1) 15 de ellas se sacrificaron entre las 56 y 72 horas posteriores al servicio,

B2) otras 15 hembras se sacrificaron a los 7 días posteriores al servicio,

B3) las restantes 15 permanecieron hasta la primera parición.

A las hembras de los grupos **A1** y **B1**:

a. Se les extirparon los ovarios identificándolos como derecho (D) e izquierdo (I), y luego de ser desprovistos de la grasa circundante se registró el número de cuerpos lúteos por observación con lupa estereoscópica a 40X (CLD y CLI).

b. Se les extirpó el útero y mediante lavado oviductal se obtuvieron potenciales embriones identificándose su procedencia (oviducto derecho u oviducto izquierdo), registrándose el número de embriones para cada caso (ED y EI).

A las hembras de los grupos **A2** y **B2**, se les extirpó el útero y se observó el número de sitios de implantación, para cada lado del tracto reproductivo, mediante evaluación macroscópica (SID y SII).

En las hembras de los grupos **A3** y **B3** se observó el tamaño de camada al nacimiento (TC).

3.2.2. Variables estudiadas

- Número de cuerpos lúteos (CL): suma del número de CL observados en los ovarios derecho e izquierdo de una hembra.
- Número de embriones (E): suma del número de E encontrados en los oviductos derecho e izquierdo de una hembra.
- Número de sitios de implantación (SI): suma del número de SI encontrados en los cuernos uterinos derecho e izquierdo de una hembra.
- Tamaño de camada (TC): número de crías nacidas en la primera parición de una hembra.
- Peso (P): peso corporal a los 49 días de edad.

3.2.3. Diferencias de caracteres de fertilidad

La asimetría de las distribuciones del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación condujo a la aplicación de la transformación raíz cuadrada, comúnmente utilizada en este tipo de variables (Sokal y Rohlf, 1979), para la realización de las pruebas de hipótesis.

Previo a la definición de las variables a utilizar, se consideró el posible efecto del lado del tracto reproductivo en el número de cuerpos lúteos, de embriones y de sitios de implantación. Es así, que se probó si existían diferencias significativas entre ambos lados para \sqrt{CL} , \sqrt{E} y \sqrt{SI} mediante pruebas de t-Student para datos apareados ($P < 0.05$).

Se calcularon los promedios y errores estándar de CL, E, SI y TC por línea. Con el fin de conocer si existía relación entre los promedios de CL, E, SI, TC y el promedio del carácter seleccionado (P) se estimaron los coeficientes de regresión de los promedios de cada variable (variables dependientes) en P (variable independiente). Se calcularon las tasas por gramo de peso corporal (CL/P, E/P, SI/P y TC/P).

Los significados de las diferencias entre líneas de CL, E, SI y TC, y de las tasas en relación al peso se estimaron mediante análisis de la variancia a un criterio de clasificación y pruebas de comparaciones múltiples HSD de Turkey-Kramer ($P < 0.05$).

La eficiencia reproductiva (ER) de las líneas a lo largo de la gestación se estimó considerando al número de cuerpos lúteos como el límite máximo del tamaño de camada al nacimiento, y calculando la tasa como cociente entre TC y CL. Para facilitar su interpretación, se estimó la pérdida embrionaria total como contracara de la eficiencia reproductiva, y se la particionó en tres, según las etapas de la gestación analizadas. El cálculo de la eficiencia y de las pérdidas se realizó con los promedios por línea, debido a que no se pudieron estimar los valores individuales porque CL, E, SI y TC se observaron en tres grupos diferentes de hembras (A1, A2 y A3). De esta manera la eficiencia y las pérdidas son estimaciones poblacionales; estas últimas se estimaron de la siguiente manera:

Pérdida relativa total: $PRT = [(CL - TC) / CL] \times 100$

Pérdida relativa de cuerpos lúteos: $PRCL = [(CL - E) / CL] \times 100$

Pérdida relativa de embriones: $PRE = [(E - SI) / CL] \times 100$

Pérdida relativa de fetos: $PRF = [(SI - TC) / CL] \times 100$

3.2.4. Diferencias de caracteres de fertilidad en hembras con estimulación ovárica

Para las hembras del Grupo B, se realizó el mismo tratamiento de los datos que el planteado en el apartado 3.2.3 para las hembras del Grupo A.

3.2.5. Efectos de la selección y de la estimulación ovárica

Se estimó el significado de la influencia de cada uno de los factores (selección y tratamiento) y de la interacción entre ambos sobre las variables CL, E, SI y TC mediante análisis de la variancia factorial a partir del siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + e_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es el valor observado de la variable de la hembra k de la línea i con tratamiento j ; μ la media general; α_i es el efecto de la línea i ; β_j es el efecto tratamiento j ; δ_{ij} es la interacción línea por tratamiento y e_{ijk} es el error aleatorio.

El efecto de la estimulación ovárica relativo al peso corporal en cada etapa gestacional y para cada línea se estimó a nivel poblacional como:

a. Incremento relativo de cuerpos lúteos:

$$IRC = \{[(CL_{CT} - CL_{ST}) / CL_{ST}] \times 100\} / P$$

donde CL_{CT} y CL_{ST} son el número medio de CL de las hembras con y sin tratamiento respectivamente.

b. Incremento relativo de embriones:

$$IRE = \{[(E_{CT} - E_{ST}) / E_{ST}] \times 100\} / P$$

donde E_{CT} y E_{ST} son el número medio de E de las hembras con y sin tratamiento respectivamente.

c. Incremento relativo de sitios de implantación:

$$IRSI = \{[(SI_{CT} - SI_{ST}) / SI_{ST}] \times 100\} / P$$

donde SI_{CT} y SI_{ST} son el número medio de SI de las hembras con y sin tratamiento respectivamente.

d. Incremento relativo del tamaño de camada:

$$IRTC = \{[(TC_{CT} - TC_{ST}) / TC_{ST}] \times 100\} / P$$

donde TC_{CT} y TC_{ST} son el número medio del TC de las hembras con y sin tratamiento respectivamente.

Para comparar la variabilidad de las líneas y de las variables observadas se calcularon los coeficientes de variación de cada variable por línea y grupo.

3.3. Caracteres de fertilidad en machos

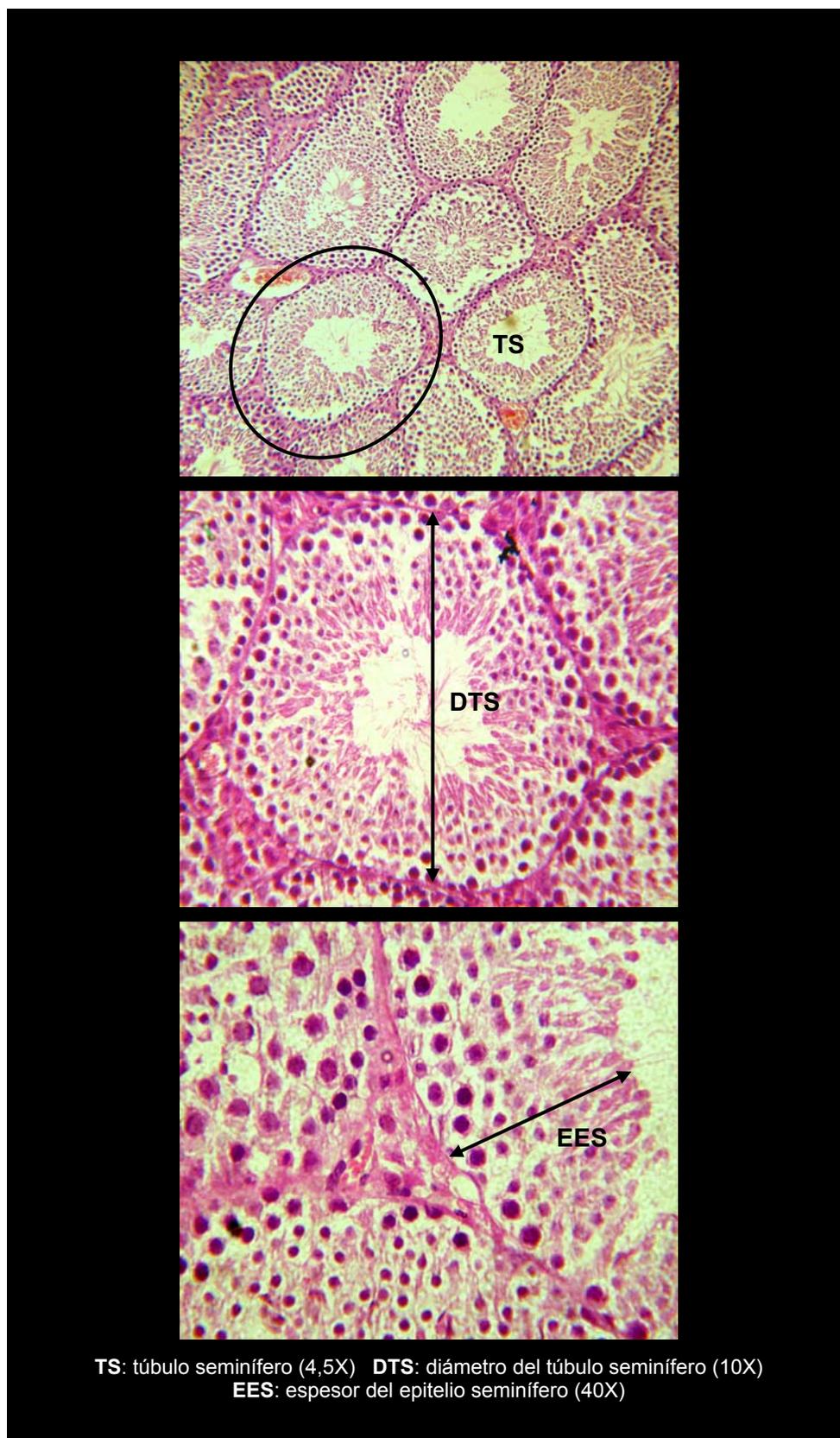
3.3.1. Peso y estructura testicular

Para comparar la estructura testicular básica de los machos de las tres líneas, se eligieron al azar 15 machos adultos (entre 75 y 90 días de edad). Después del sacrificio, se extirparon ambos testículos, se despojaron de la grasa circundante y se pesaron. Los testículos se fijaron por inmersión en una solución al 10% de formaldehído tamponado con fosfato bisódico anhidro y fosfato monosódico monohidratado, se incluyeron en parafina y se cortaron y se colorearon con hematoxilina-eosina. Se identificaron 100 túbulos seminíferos por animal, se les midió el diámetro y el espesor de su epitelio (Fig. 5) mediante ocular micrométrico (Sobarzo y col., 2000; De la Cruz Ramírez y col., 2004; Bustos-Obregón y col., 2005).

3.3.2. Concentración espermática y porcentaje de células anormales

La comparación de la concentración espermática y del porcentaje de células anormales de los machos de las tres líneas se llevó a cabo en 15 machos adultos (entre 75 y 90 días de edad) por línea (*t*, *s* y *s'*) elegidos al azar. Se sacrificaron y se les extirpó la porción más caudal de los epidídimos y los respectivos conductos deferentes. Estos se colocaron en una Placa de Petri con 2ml de solución de NaCl al 0.9% durante 24 horas a 4°C. El material fue fragmentado tratando de lograr una suspensión homogénea.

Fig. 5. Microfotografías ópticas de testículo teñidas con hematoxilina y eosina



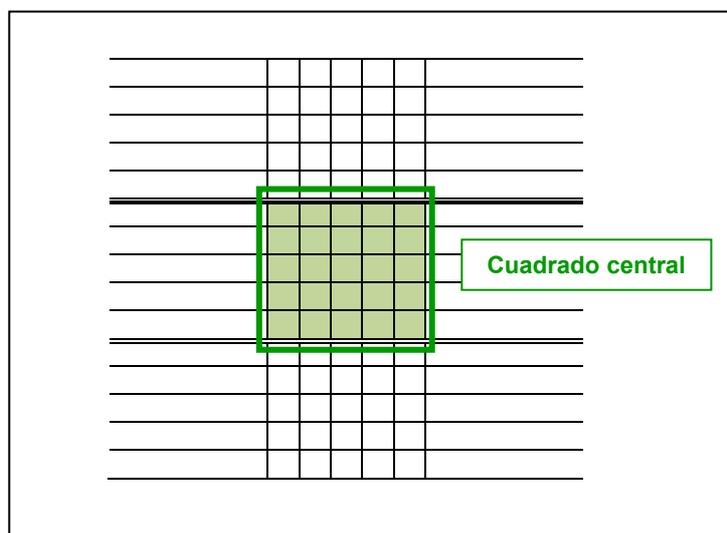
Para el conteo espermático, se tomaron alícuotas de esa suspensión y se colocaron en una cámara hemocitométrica de Neubauer. Se contaron todos los espermatozoides del cuadrado grande central (E_{cgc}) (Fig. 6). El número de espermatozoides por mililitro de semen, expresado en millones, se calculó de la siguiente manera:

$$E_{mill/ml} = E_{cgc} * VC * FD$$

donde: VC es el volumen de la cámara de Neubauer y FD es el factor de dilución (Palma, 2008b).

La morfología de los espermatozoides se evaluó en alícuotas de suspensión fijadas en formol y extendidas en un portaobjetos, las que se colorearon con hematoxilina-eosina y se examinaron bajo microscopio óptico a 1000X. Por cada muestra se analizaron 100 espermatozoides y se identificaron normales y no normales (Sobarzo y col., 2000; De la Cruz Ramírez y col., 2004; Bustos-Obregón y col., 2005). En la Fig. 7 se muestra la morfología del espermatozoide evaluado como normal. Las células consideradas morfológicamente anormales fueron aquellas que presentaron cabeza triangular, colapsada o en martillo, presencia de curvatura a nivel de la pieza intermedia, cola rectilínea o con curvatura (en distintos grados) tanto en la porción media como distal de la misma (Kawai y col., 2006).

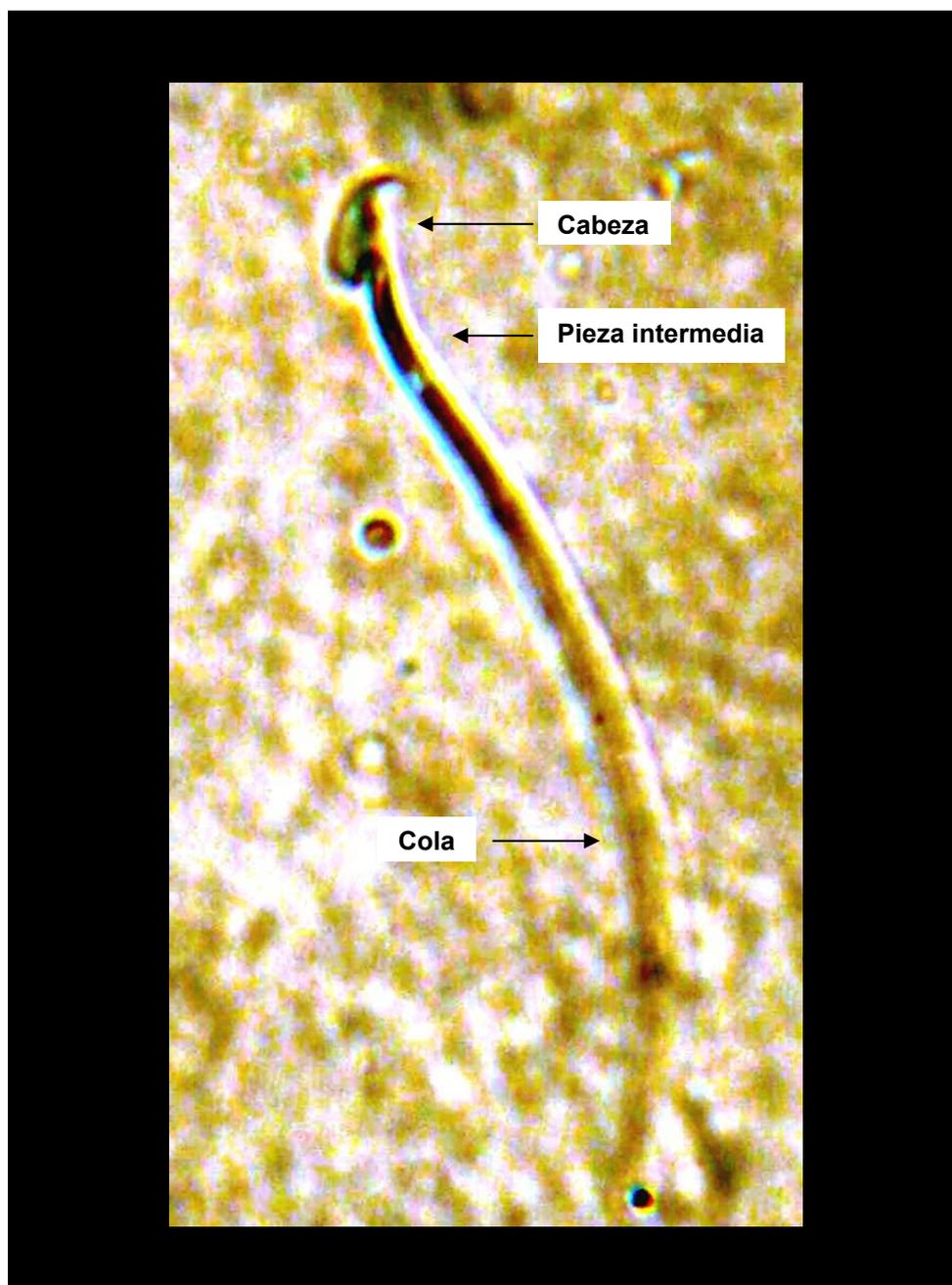
Fig. 6. Cámara de Neubauer. Recuento de espermatozoides



3.3.3. Motilidad, progresividad y vigor de los espermatozoides

Se utilizaron 23 machos adultos (entre 75 y 90 días de edad) para cada una de las líneas. Los conductos deferentes y la región caudal de los epidídimos de cada individuo se colocaron en una placa de Petri conteniendo 1ml de medio HOLDING Plus (BIONICHE, Pullman, WA, USA). Para facilitar la dispersión del esperma se cortaron en pequeños segmentos sobre los que se practicaron varias incisiones con una aguja 30G. Las placas con el material detallado se mantuvieron a 37°C en baño María por 10 minutos. Se cargó una alícuota de cada muestra en una cámara de Makler de 20 μ l y se analizaron 6 campos microscópicos. Sólo se tuvieron en cuenta para el estudio las muestras que contaron al menos con 1000 células totales.

Fig. 7. Microfotografía óptica del espermatozoide de ratón (1000X)



Los parámetros de motilidad, progresión y vigor (Parámetros CASA: Computer Assisted Semen Analysis) se determinaron utilizando un analizador de semen Ceros 12.1 (Hamilton Thorne, Biosciences, Inc., Beverly, MA, USA), del Centro Genético Bovino EOLIA S.A. (Marcos Paz, Buenos Aires). El *setup* elegido fue el Mouse 2 y las especificaciones correspondientes se detallan en el Anexo II (Hamilton Thorne Biosciences, 2002).

3.3.4. Variables estudiadas

Peso y estructura testicular:

- Peso testicular (PTEST): peso promedio de ambos testículos por animal, en gramos.
- Diámetro del tubo seminífero (DTS): promedio del diámetro mayor de 100 túbulos seminíferos por macho, expresado en micrómetros.
- Espesor del epitelio seminífero (EES): promedio de la altura del epitelio que recubre la luz de 100 túbulos seminíferos de cada animal, en micrometros.

Concentración espermática y porcentaje de células anormales:

- Número de espermatozoides (NE): cantidad de espermatozoides por macho expresado en millones/mililitro.

- Número de espermatozoides anormales (AN): número de espermatozoides que no presentan morfología normal sobre un total de 100 evaluados por animal.

Motilidad, progresividad y vigor de los espermatozoides:

- Porcentaje de espermatozoides móviles (%MOT): porcentaje de células que tienen movimiento.
- Porcentaje de espermatozoides progresivos (%PRO): porcentaje de células que siendo móviles, describen un desplazamiento hacia delante.

Parámetros de vigor:

- Velocidad curvilineal (VCL): velocidad calculada sobre el camino real del espermatozoide entre dos puntos, expresada en micrones por segundo. Describe la motilidad real de los espermatozoides (Fig. 8).
- Amplitud lateral de la cabeza (ALH): distancia promedio del desplazamiento de la cabeza desde la posición media del camino, expresada en micrones.
- Frecuencia de batido (BCF): frecuencia de los movimientos laterales de la cabeza del espermatozoide, expresada en Hertz (Hz).

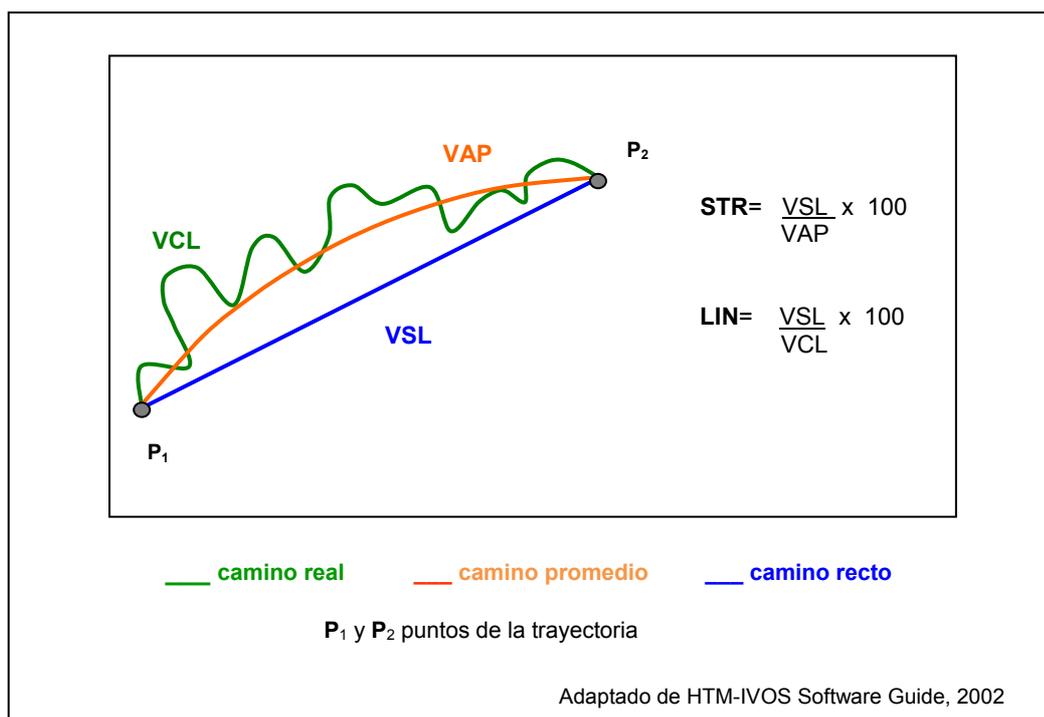
Parámetros de progresividad:

- Velocidad lineal (VSL): velocidad del espermatozoide sobre una línea recta entre dos puntos medida en micrones por segundo (Fig. 8).

- Velocidad promedio en su trayectoria (VAP): velocidad promedio del espermatozoide sobre el camino real entre dos puntos de su trayectoria, expresada en micrones por segundo (Fig. 8).
- Rectitud (STR= (VSL/VAP)*100): mide la desviación de la velocidad promedio a la velocidad en línea recta y se expresa en porcentaje (Fig. 8).
- Linearidad (LIN= (VSL/VCL)*100): mide la desviación de la velocidad del camino real a la velocidad en línea recta y se expresa en porcentaje (Fig. 8).

Los parámetros VCL, ALH y BCF se consideraron medidas que reflejan el vigor de los espermatozoides, y los parámetros VSL, STR y LIN la progresividad, según la categorización realizada por Cancel y col. (2000).

Fig. 8. Razones entre las velocidades de los espermatozoides



3.3.5. Análisis realizados

Para cada variable (PTEST, DTS, EES, NE, %AN, %MOT, %PRO, VAP, VSL, VCL, STR, LIN, ALH, BCF) se estimaron los promedios y errores estándar.

Se probó si existían diferencias significativas entre las líneas mediante la aplicación de análisis de la variancia a un criterio de clasificación y pruebas de comparaciones múltiples HSD de Turkey-Kramer ($P < 0.05$). Debido a la asimetría de las distribuciones de las variables que se utilizaron para describir la motilidad, la progresividad y el vigor de los espermatozoides se aplicó la transformación raíz cuadrada previo a la realización de las pruebas de hipótesis correspondientes (Sokal y Rohlf, 1979).

La relación entre la estructura testicular y el peso corporal se estimó mediante los coeficientes de regresión simples de PTEST (variable dependiente) en P (variable independiente) ($P < 0.05$) y de DTS y EES (variables dependientes) en PTEST (variable independiente) ($P < 0.05$).

Todos los análisis estadísticos realizados tanto en hembras como en machos fueron elaborados utilizando el programa JMP en su versión 5.0 para Windows (JMP®, SAS Institute, 2003).

4. RESULTADOS

4.1. Caracteres de fertilidad en hembras

4.1.1. Diferencias entre ambos lados del tracto reproductivo

El número medio y los errores estándar de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación del lado izquierdo y del lado derecho del aparato reproductor de las hembras de cada línea se muestran en el Cuadro I. Los valores del lado derecho frecuentemente fueron más altos que los observados para el lado izquierdo, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre lados. Esto último, permitió no tener en cuenta la procedencia de los cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y definir las variables como la suma de ambos lados por hembra, cuyos promedios y errores estándar se presentan en el punto siguiente.

CUADRO I. Promedios y errores estándar del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación del lado izquierdo y del lado derecho del tracto reproductivo en tres líneas de ratones

LÍNEA	CLI \pm ES	CLD \pm ES	EI \pm ES	ED \pm ES	SII \pm ES	SID \pm ES
t	9.11 \pm 0.73 a	10.00 \pm 0.58 a	5.89 \pm 0.56 b	7.11 \pm 0.51 a	6.11 \pm 0.42 a	5.78 \pm 0.40 a
s	6.22 \pm 0.52 a	6.33 \pm 0.80 a	4.44 \pm 0.65 a	5.11 \pm 0.65 a	4.44 \pm 0.44 a	4.22 \pm 0.68 a
s'	11.11 \pm 0.82 a	11.56 \pm 1.07 a	8.89 \pm 0.59 a	8.67 \pm 0.82 a	6.00 \pm 0.90 a	7.00 \pm 0.62 a

CLI y CLD: número de cuerpos lúteos del lado izquierdo y derecho. EI y ED: número de embriones del lado izquierdo y derecho. SII y SID: número de sitios de implantación del lado izquierdo y derecho.

Letras distintas indican diferencias significativas entre lados izquierdo y derecho; $P < 0.05$

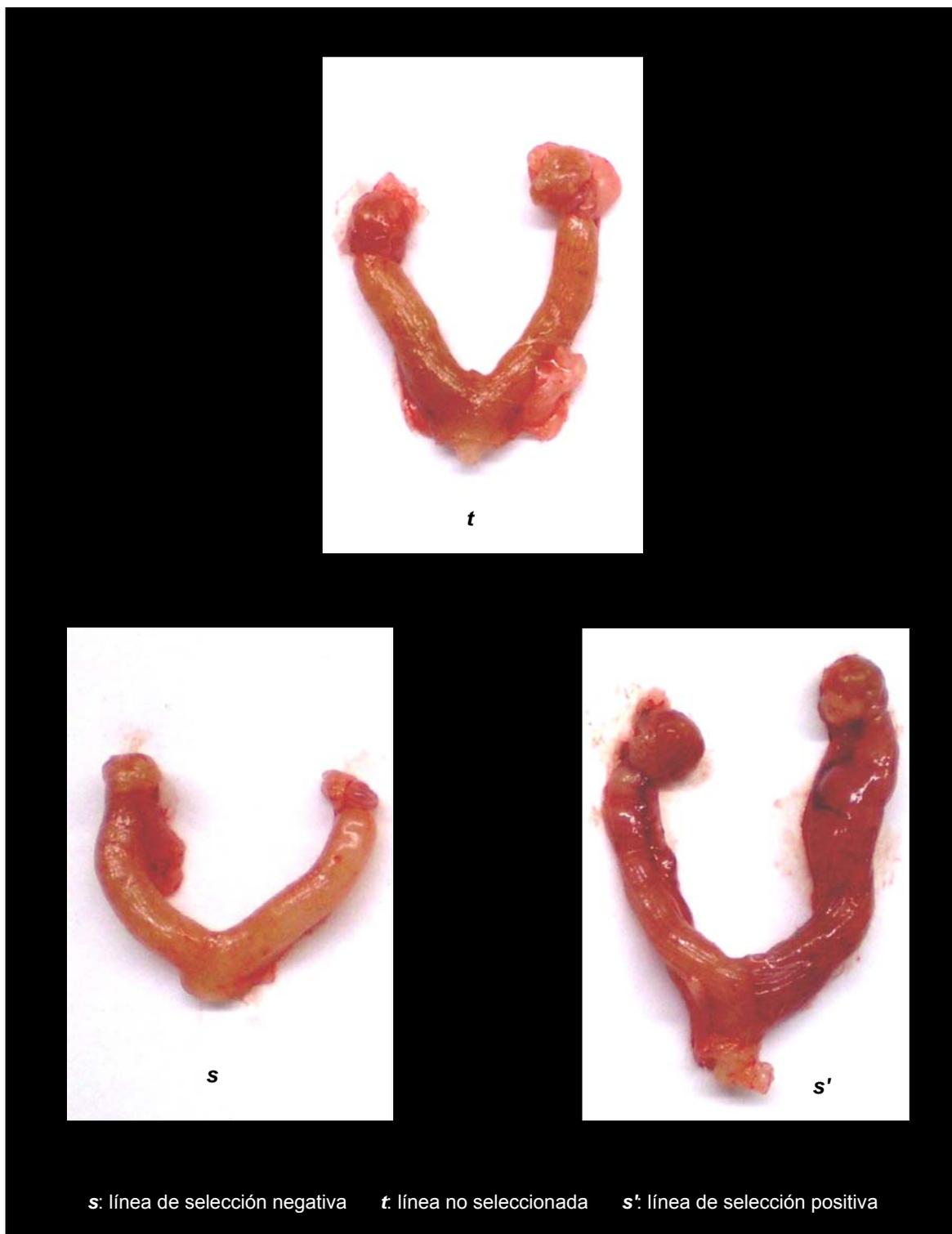
4.1.2. Relación de la fertilidad con el peso corporal

Al extraer los ovarios y los oviductos para su procesamiento, se pudo observar a simple vista la relación del tamaño del aparato reproductor de la hembra con el peso corporal, según muestran las fotos de la Fig. 9. El tamaño de estos órganos fue mayor cuanto mayor fue el peso corporal de las hembras, es decir, aumentó para las hembras de la línea seleccionada para alto peso (**s'**) con respecto a las de la línea testigo de peso intermedio (**t**), y de éstas con respecto a las de la línea seleccionada para bajo peso (**s**).

Las hembras de la línea no seleccionada (**t**) fueron más homogéneas en su peso corporal, en el número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y en el tamaño de camada, si se las compara con las de las líneas seleccionadas, independientemente de que lo sean para alto o bajo peso, según se desprende de los valores de los errores estándar del Cuadro II. No hubo, entonces, un aumento de la variabilidad en relación directa con el peso corporal sino más bien con la relación no seleccionada–seleccionadas.

Desde la ovulación hasta cumplidos los 7 u 8 días de desarrollo embrionario, las hembras de las líneas seleccionadas alcanzaron valores extremos para los promedios del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación en el mismo sentido de la selección realizada; correspondiendo los valores intermedios entre ambas, a las de la línea no seleccionada. Sin embargo, al momento de la parición, el tamaño de camada de las hembras de esta línea (**t**) superó al de las seleccionadas (**s** y **s'**) (Cuadro II).

Fig. 9. Ovarios y oviductos de ratones seleccionados por peso



CUADRO II. Promedios y errores estándar de peso, del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada al nacimiento en tres líneas de ratones

LÍNEA	P \pm ES	CL \pm ES	E \pm ES	SI \pm ES	TC \pm ES
t	26.12 \pm 0.43 b	19.11 \pm 1.02 a	13.00 \pm 0.94 b	11.89 \pm 0.51 a	11.44 \pm 0.73 a
s	20.84 \pm 0.57 c	12.56 \pm 1.09 b	9.56 \pm 1.02 b	8.67 \pm 0.83 b	7.44 \pm 0.82 b
s'	31.11 \pm 1.06 a	22.67 \pm 1.79 a	17.50 \pm 1.33 a	13.00 \pm 1.14 a	10.22 \pm 1.06 ab

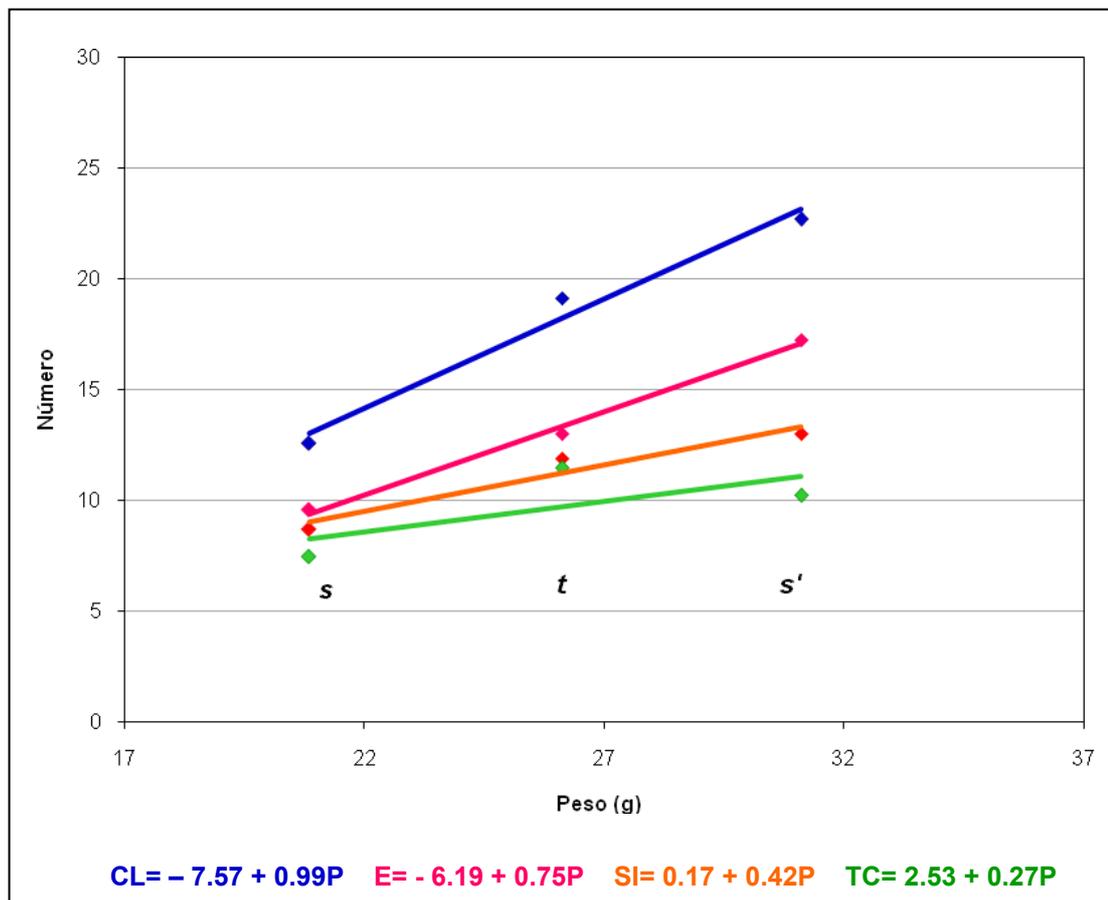
P: peso a los 49 días. CL: número de cuerpos lúteos. E: número de embriones. SI: número de sitios de implantación. TC: tamaño de camada al nacimiento

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas; P<0.05

La variación descrita de los promedios de las variables reproductivas en función del peso se visualiza en las regresiones de cada una de ellas sobre el peso (Fig. 10). Las pendientes decrecieron a medida que avanzó el proceso de gestación y lo mismo ocurrió con los coeficientes de determinación. Desde la ovulación hasta la parición, el efecto del peso se fue diluyendo y el peso explicó una menor proporción de la variabilidad cuando se pasó del análisis de CL, E y SI a TC ($R^2_{CL}=0.98$, $R^2_E=0.99$, $R^2_{SI}=0.93$, $R^2_{TC}=0.48$).

Las diferencias encontradas entre las líneas para el número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y el tamaño de camada perdieron significado cuando se analizaron en proporción al peso corporal. En función del peso de la madre, por cada gramo a los 49 días de edad, tanto las hembras de la línea sin selección como las de las líneas seleccionadas fueron capaces de mantener un número medio similar de cuerpos lúteos, embriones, sitios de implantación y crías paridas (Cuadro III).

Fig. 10. Regresión del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada en peso



CUADRO III. Tasas del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada sobre el peso en tres líneas de ratones

LINEA	CL/P	E/P	SI/P	TC/P
<i>t</i>	0.734 ± 0.049	0.503 ± 0.044	0.475 ± 0.023	0.434 ± 0.034
<i>s</i>	0.624 ± 0.058	0.471 ± 0.049	0.408 ± 0.038	0.382 ± 0.055
<i>s'</i>	0.710 ± 0.057	0.554 ± 0.050	0.459 ± 0.048	0.364 ± 0.063

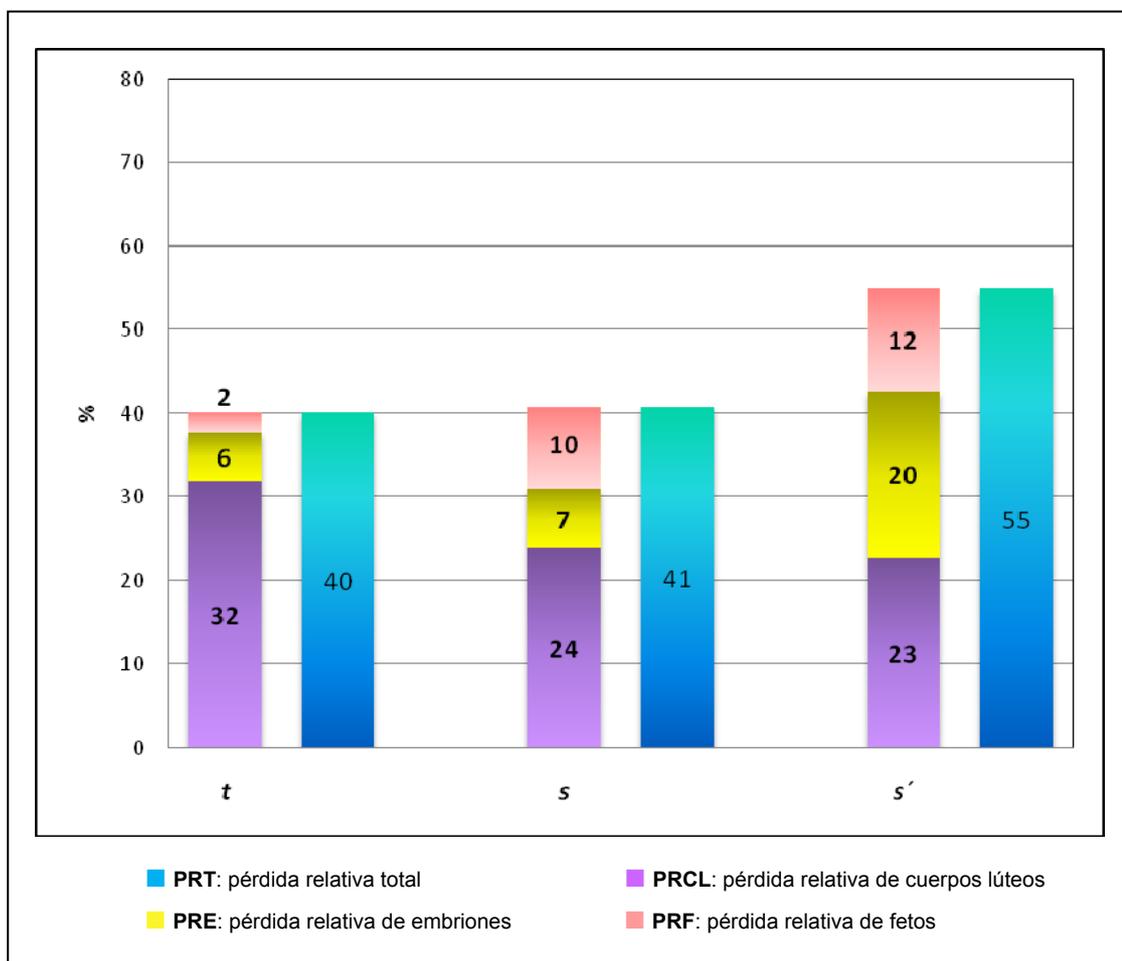
CL: número de cuerpos lúteos. E: número de embriones. SI: número de sitios de implantación.
TC: tamaño de camada. P: peso

4.1.3. Eficiencia reproductiva de las líneas

Al relacionar el tamaño de camada con el número de cuerpos lúteos se observó que las líneas **t** y **s** tuvieron una eficiencia reproductiva similar ($ER_t = 0.60$, $ER_s = 0.59$) y superior a la de la línea **s'** ($ER_{s'} = 0.45$). Dicho de otra manera, **s'** fue la línea con mayor pérdida gestacional. Si bien todas las líneas tuvieron las mayores pérdidas en la primera etapa (PRCL), las proporciones fueron diferentes. En el caso de **t**, las hembras perdieron el 80% (32/40) de los cuerpos lúteos y en **s'** prácticamente la mitad, un 42% (23/55). Las hembras de esta última línea fueron las que presentaron mayores pérdidas de embriones y de fetos (Fig. 11).

En síntesis, el tamaño del aparato reproductivo y la capacidad embrionaria de las hembras de estas líneas dependió del peso corporal. Durante el primer tercio de la gestación, la capacidad de producir cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación estuvo relacionada directamente con el peso. Más tarde, se incrementaron las pérdidas de fetos en las hembras más pesadas, resultando en un tamaño de camada similar en las más pesadas con respecto a las de peso intermedio (**t**). Las hembras más pesadas tuvieron un potencial reproductivo mayor pero menor eficiencia reproductiva, con mayores pérdidas gestacionales y demoradas en el tiempo.

Fig. 11. Pérdidas totales y por etapas de la gestación por línea



4.2. Caracteres de fertilidad en hembras con estimulación ovárica

4.2.1. Diferencias entre ambos lados del tracto reproductivo

Al igual que en las hembras del Grupo A, no se tuvo en cuenta la procedencia de los cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación dado que no se encontraron diferencias significativas entre los lados derecho e izquierdo

del aparato reproductivo (Cuadro IV), utilizándose la suma de ambos lados por hembra para cada variable observada.

CUADRO IV. Promedios y errores estándar del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación del lado izquierdo y del lado derecho del tracto reproductivo en tres líneas de ratones. Hembras con estimulación ovárica

LÍNEA	CLI \pm ES	CLD \pm ES	EI \pm ES	ED \pm ES	SII \pm ES	SID \pm ES
<i>t</i>	15.40 \pm 0.94	15.67 \pm 0.94	12.47 \pm 0.77	12.93 \pm 0.87	8.33 \pm 0.47	8.93 \pm 0.41
<i>s</i>	11.27 \pm 0.52	11.73 \pm 0.65	10.47 \pm 0.85	11.33 \pm 0.83	6.53 \pm 0.56	6.47 \pm 0.35
<i>s'</i>	18.07 \pm 0.82	18.47 \pm 0.75	16.00 \pm 0.86	16.73 \pm 0.69	8.73 \pm 0.67	8.13 \pm 0.99

CLI y CLD: número de cuerpos lúteos del lado izquierdo y derecho. EI y ED: número de embriones del lado izquierdo y derecho. SII y SID: número de sitios de implantación del lado izquierdo y derecho.

4.2.2. Relación de la fertilidad con el peso corporal

En el Cuadro V se muestran los promedios y errores estándar por línea del peso, del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y del tamaño de camada. Los errores estándar de la línea *t* parecen disminuir hacia el final de la gestación con respecto a los de *s* y *s'*. Los promedios mayores del número de cuerpos lúteos y embriones correspondieron a la línea más pesada, les siguieron los de la no seleccionada y por último los de la línea de bajo peso. Esta relación con el peso corporal se anuló para el número de sitios de implantación hasta alcanzar la línea *t* el mayor tamaño de camada promedio. La línea *s* mantuvo para todas las variables los valores más bajos.

Al igual que para las hembras del Grupo A, las variables reproductivas observadas disminuyeron su dependencia del peso corporal en el transcurso del proceso gestacional desde la ovulación hasta la parición. La Fig. 12 muestra las rectas y los coeficientes de regresión estimados de cada una de las variables (CL, E, SI, TC) en peso a los 49 días de edad, para las tres líneas. El coeficiente de determinación fue prácticamente uno para cuerpos lúteos y embriones, no así, para sitios de implantación y muy bajo para tamaño de camada, demostrando que el peso corporal de la madre poco puede explicar de la variabilidad del tamaño de camada en las hembras con estimulación ovárica ($R^2_{CL}=0.92$; $R^2_E=1.00$; $R^2_{SI}=0.50$; $R^2_{TC}=0.06$).

CUADRO V. Promedios y errores estándar de peso, número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada en tres líneas de ratones.

Hembras con estimulación ovárica

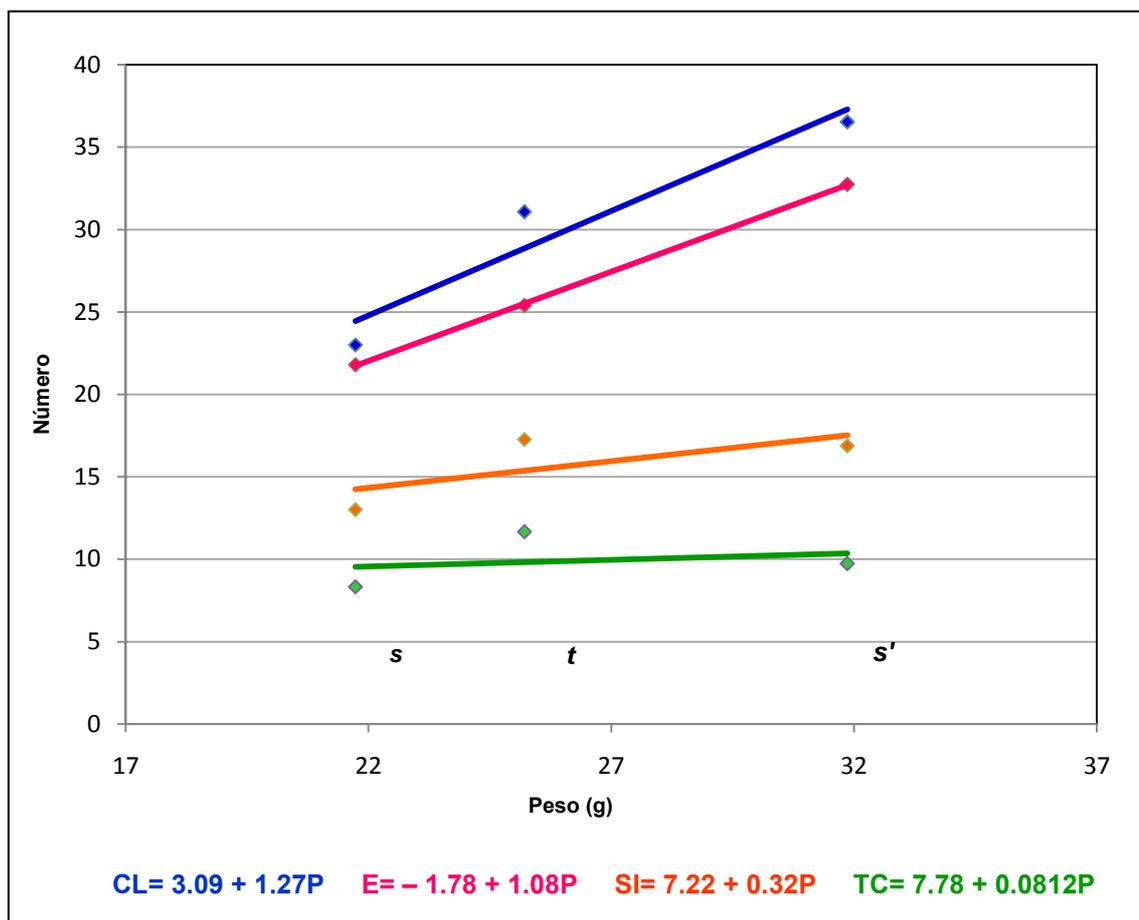
LÍNEA	P \pm ES	CL \pm ES	E \pm ES	SI \pm ES	TC \pm ES
t	25.21 \pm 0.42 b	31.07 \pm 1.04 b	25.40 \pm 1.37 b	17.27 \pm 0.71 a	11.67 \pm 0.56 a
s	21.73 \pm 0.23 c	23.00 \pm 0.88 c	21.80 \pm 1.35 b	13.00 \pm 0.75 b	8.33 \pm 0.72 b
s'	31.86 \pm 0.52 a	36.53 \pm 1.16 a	32.73 \pm 1.10 a	16.87 \pm 1.11 ab	9.73 \pm 0.73 ab

P: peso. CL: número de cuerpos lúteos. E: número de embriones.

SI: número de sitios de implantación. TC: tamaño de camada

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas; $P < 0.05$

Fig. 12. Regresión del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada en peso. Hembras con estimulación ovárica



La proporción de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación en relación al peso corporal (carácter seleccionado) fue similar para todas las líneas, excepto para el tamaño de camada. La línea *s'* fue la que tuvo menos crías por gramo de peso de madre y el valor más alto correspondió a la línea *t* (Cuadro VI).

CUADRO VI. Tasas del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada sobre peso en tres líneas de ratones. Hembras con estimulación ovárica

LINEA	CL/P	E/P	SI/P	TC/P
t	1.241 ± 0.063 a	1.013 ± 0.053 a	0.670 ± 0.029 a	0.494 ± 0.044 a
s	1.069 ± 0.060 a	1.016 ± 0.081 a	0.611 ± 0.046 a	0.391 ± 0.033 ab
s'	1.108 ± 0.085 a	1.025 ± 0.065 a	0.545 ± 0.051 a	0.333 ± 0.039 b

CL: número de cuerpos lúteos, E: número de embriones, SI: número de sitios de implantación, TC: tamaño de camada, P: peso

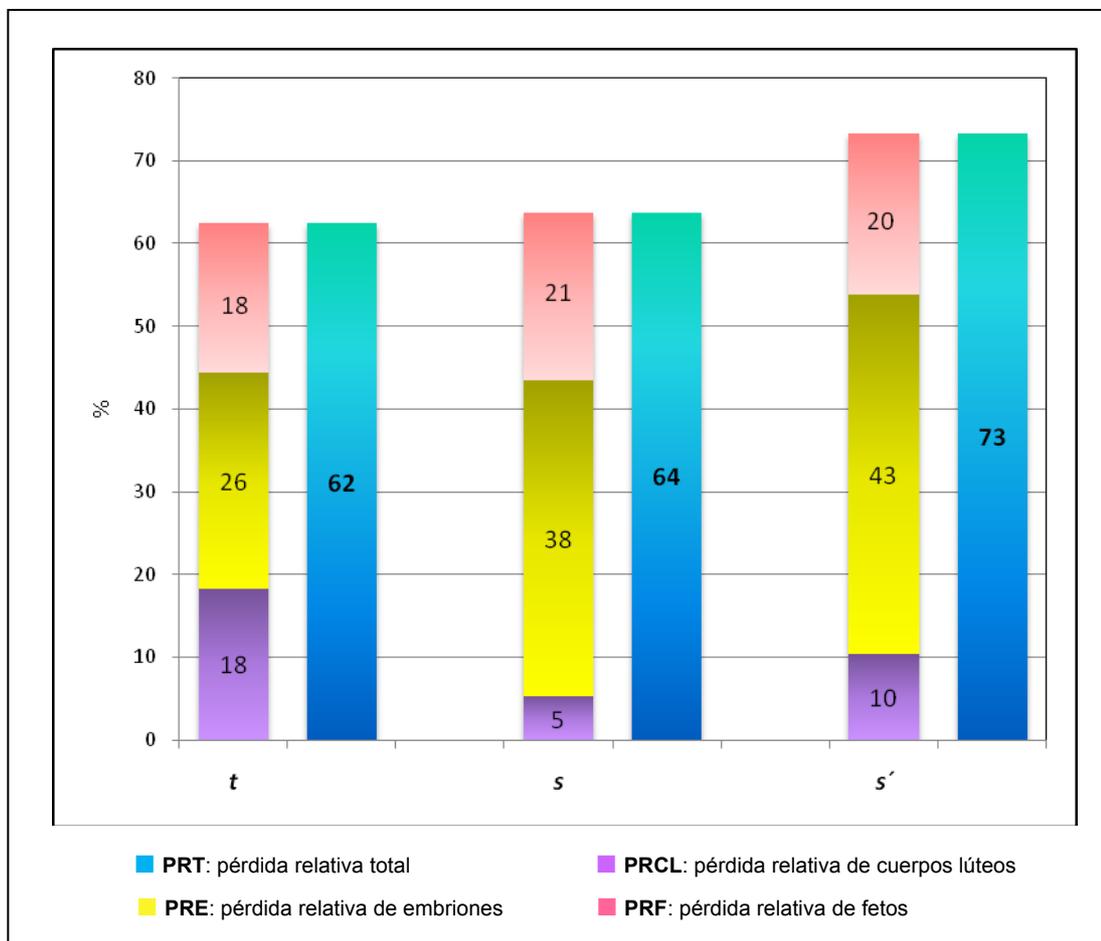
Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, P<0.05

4.2.3. Eficiencia reproductiva de las líneas

La relación entre el tamaño de camada y el número de cuerpos lúteos demostró que las hembras de las líneas **t** y **s** tuvieron una mayor capacidad para convertir los oocitos ovulados en crías al momento de la parición ($ER_t = 0.37$, $ER_s = 0.36$, $ER_{s'} = 0.27$).

Al evaluar las pérdidas ocurridas durante la preñez se observó que el mayor porcentaje correspondió, nuevamente, a las hembras seleccionadas para alto peso (Fig. 13). En cambio, al analizar las pérdidas por etapa se vio que las líneas seleccionadas, en relación a la testigo, tuvieron una pérdida menor durante el primer período evaluado (PRCL), fueron mayores que en aquella durante la segunda etapa (PRE) y similares en la tercera (PRF) (Fig. 13).

Fig.13. Pérdidas totales y por etapas de la gestación por línea
Hembras con estimulación ovárica



Resumiendo, la capacidad de producir cuerpos lúteos y embriones de las hembras estimuladas de estas líneas dependió del peso corporal de la madre, pero ya en la implantación este efecto dejó de tener significado. Las hembras de la línea más pesada tuvieron mayores pérdidas de embriones resultando en un tamaño de camada al nacimiento menor que en las hembras de la línea *t*. Con la estimulación ovárica se mantuvo un potencial reproductivo mayor en las hembras

más pesadas, seguido de una menor eficiencia reproductiva, con mayores pérdidas gestacionales y más tardías.

4.2.4. Efectos de la selección y de la estimulación ovárica

Los resultados del análisis factorial mostraron que el número medio de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación varió tanto en función de la línea (del peso corporal) como del tratamiento. El número de crías al nacimiento sólo estuvo influenciado por el efecto de la selección (Cuadro VII).

Cuadro VII. Significado de los efectos de la selección y del tratamiento sobre el número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada

Diferencias entre	CL	E	SI	TC
LINEAS	***	***	***	***
TRATAMIENTOS	***	***	***	<i>n.s.</i>
INTERACCIÓN	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

CL: número de cuerpos lúteos, E: número de embriones, SI: número de sitios de implantación y TC: tamaño de camada
 *** P<0.001 *n.s.* P>0.001

El tratamiento con gonadotrofinas incrementó el número medio de embriones (IRE) en mayor proporción que el resto de las variables para las tres líneas. La

línea **s** fue la que mejor respondió al tratamiento planteado, partió de un menor potencial reproductivo y alcanzó mayores IRCL, IRE, IRSI, IRTC (Cuadro VIII).

Cuadro VIII. Incremento relativo del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y tamaño de camada en tres líneas de ratones

	t	S	s'
IRCL	2.44	3.91	1.94
IRE	3.72	6.02	2.85
IRSI	1.76	2.35	0.94
IRTC	0.08	0.56	-0.15

IRCL: incremento relativo del número de cuerpos lúteos. **IRE**: incremento relativo del número de embriones. **IRSI**: incremento relativo del número de sitios de implantación.
IRTC: incremento relativo del tamaño de camada.

Al analizar la variabilidad mediante los coeficientes de variación de cada variable se pudo observar que los valores más altos correspondieron a las hembras del Grupo A (no estimuladas) y, dentro de ellas, la mayor variación de CL, E, SI y TC se observó en las hembras de las líneas seleccionadas. A su vez, la línea **s** fue más inestable que la línea **s'**. Para las hembras del Grupo B (con estimulación ovárica) las líneas seleccionadas tuvieron mayor variabilidad que **t** para SI y TC (Cuadro IX).

La estimulación ovárica produjo menores eficiencias reproductivas totales para las tres líneas. En todos los casos, las pérdidas gestacionales fueron

mayores bajo el tratamiento y se manifestaron más tardíamente, principalmente en las pérdidas de sitios de implantación (Fig. 11 y 13).

Cuadro IX. Coeficientes de variación de peso, del número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y del tamaño de camada por línea. Hembras estimuladas y no estimuladas

		<i>t</i>	<i>S</i>	<i>s'</i>
Grupo A	P	1.65	2.74	3.41
	CL	5.34	8.68	7.90
	E	7.23	10.67	7.60
	SI	4.29	9.57	8.77
	TC	6.38	11.02	10.37
Grupo B	P	1.67	1.06	1.63
	CL	3.35	3.83	3.18
	E	5.39	6.19	3.36
	SI	4.11	5.77	6.58
	TC	4.80	8.64	7.50

Grupo A: hembras no estimuladas. **Grupo B:** hembras con estimulación ovárica. **P:** peso. **CL:** número de cuerpos lúteos. **E:** número de embriones. **SI:** número de sitios de implantación. **TC:** tamaño de camada

4.3. Caracteres de fertilidad en machos

4.3.1. Peso y estructura testicular

En la Fig. 14 se muestran los testículos, epidídimos y conductos deferentes de los machos de las tres líneas. A simple vista se evidencian diferencias en el

tamaño de las mencionadas estructuras, si bien, dichas diferencias no son tan notorias como se comentó para los órganos reproductivos de las hembras.

Los promedios y errores estándar del peso testicular, del diámetro de los túbulos seminíferos y de la altura de su epitelio se encuentran en el Cuadro X. El peso de los testículos de los machos seleccionados para alto peso fue significativamente mayor al compararlo con el peso testicular de los animales seleccionados para bajo peso y con los no seleccionados. Se observó que si bien las líneas no se diferenciaron significativamente en el diámetro del túbulo, sí lo hicieron al evaluar el alto del epitelio (Fig. 5). La línea **s'** tuvo el mayor espesor, seguida por la línea **t** y finalmente la línea **s** (Cuadro X).

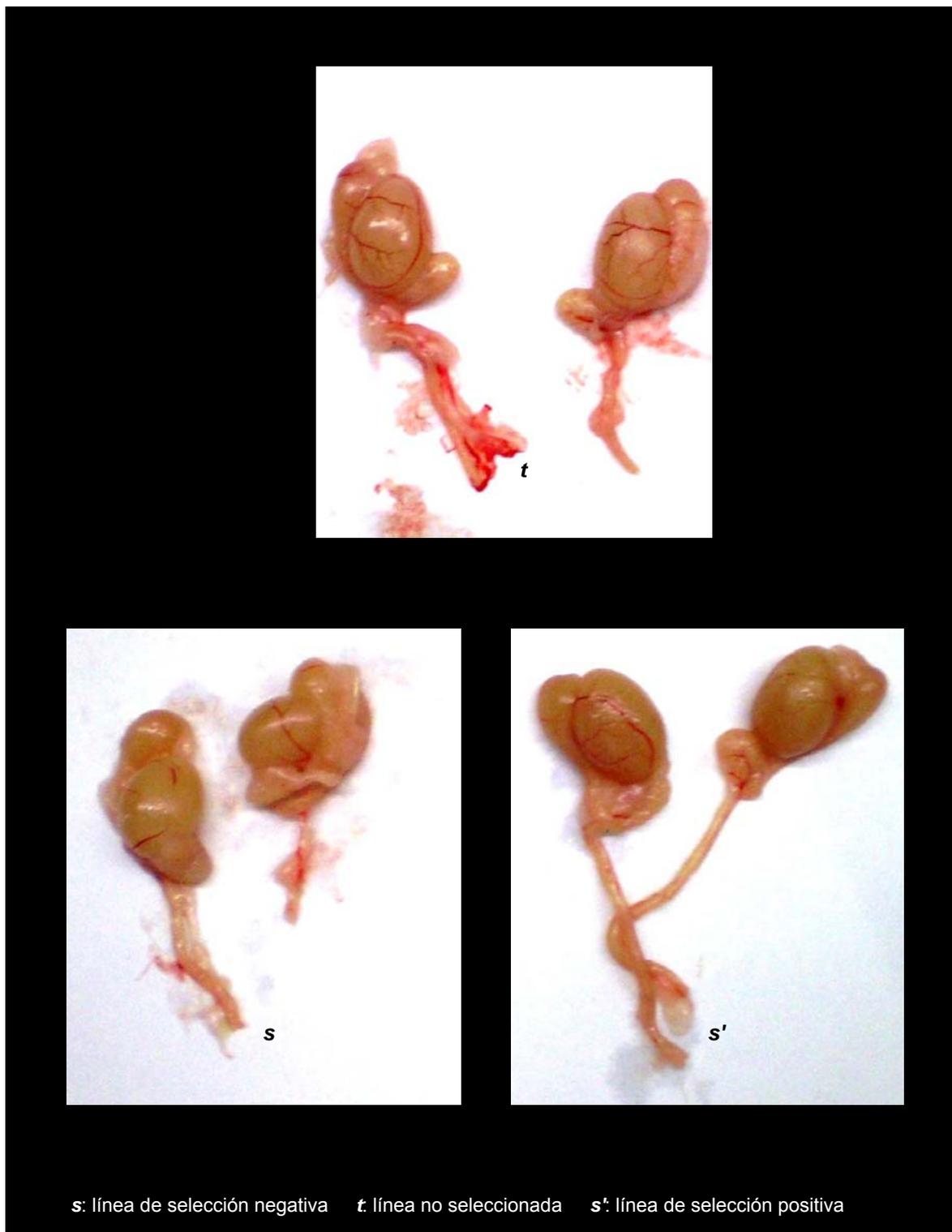
CUADRO X. Promedios y errores estándar de peso, peso de testículos, diámetro del túbulo seminífero y espesor del epitelio seminífero en tres líneas de ratones

LÍNEA	P ± ES	PTEST ± ES	DTS ± ES	EES ± ES
t	30.69 ± 0.56 b	0.21 ± 0.01 b	190.86 ± 0.77 a	59.67 ± 0.74 ab
s	26.13 ± 0.35 c	0.18 ± 0.01 b	183.83 ± 3.49 a	58.21 ± 0.20 b
s'	37.46 ± 0.81 a	0.25 ± 0.01 a	186.14 ± 3.53 a	60.35 ± 0.12 a

P: peso. **PTEST:** peso de los testículos. **DTS:** diámetro del tubo seminífero. **EES:** espesor del epitelio seminífero.

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, P<0.05

Fig. 14. Testículos, epidídimos y conductos deferentes de ratones seleccionados por peso



En el Cuadro XI se muestran los coeficientes de regresión del peso testicular en peso corporal, del diámetro del túbulo seminífero en el peso testicular, y del espesor del epitelio seminífero en el peso testicular. De los mismos surge que el peso testicular está significativa y positivamente relacionado con el peso corporal, y el diámetro de los túbulos seminíferos con el peso testicular en las tres líneas.

Cuadro XI. Coeficientes de regresión del peso testicular en el peso corporal y del diámetro de los túbulos seminíferos y del espesor del epitelio en el peso de los testículos en tres líneas de ratones

B	t	s	s'
Ptest-P	0.010 ***	0.004 ***	0.004 **
DTS-Ptest	69.30 ***	709.68 ***	276.62 ***
EES-Ptest	-16.96 <i>n.s.</i>	-7.89 <i>n.s.</i>	-3.36 <i>n.s.</i>

*** P<0.001 ** P<0.005 *n.s.* no significativo

4.3.2. Concentración espermática y porcentaje de células anormales

El conteo de espermatozoides por mililitro de semen fue significativamente mayor en los animales de la línea seleccionada para alto peso. Los animales sin selección tuvieron un número intermedio entre los de las líneas seleccionadas y el menor valor correspondió a los animales de la línea seleccionada para bajo

peso. El porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas no difirió significativamente entre las líneas (Cuadro XII).

CUADRO XII. Promedios y errores estándar del número de espermatozoides y del porcentaje de células anormales en tres líneas de ratones

LÍNEA	P \pm ES	NE \pm ES	AN \pm ES
t	30.69 \pm 0.56 b	603.16 \pm 5.73 ab	1.91 \pm 0.15 a
s	26.13 \pm 0.35 c	584.23 \pm 8.58 b	2.15 \pm 0.21 a
s'	37.46 \pm 0.81 a	616.94 \pm 10.24 a	2.42 \pm 0.26 a

P: peso. NE: número de espermatozoides (millones/mililitro). AN: número de espermatozoides anormales (porcentaje).

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, P<0.05

4.3.3. Motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides

Los promedios y errores estándar de parámetros de motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides (parámetros CASA) se detallan en el Cuadro XIII. El análisis de la variancia efectuado no arrojó diferencias significativas entre las líneas indicando que la calidad seminal fue similar para los machos de las tres líneas; bajo las condiciones del *setup* utilizado, la velocidad, el vigor y la progresividad de los espermatozoides fue similar (ver Anexo II).

En síntesis, el peso testicular, el alto del túbulo seminífero y la concentración de espermatozoides aumentaron en función del peso corporal. La

calidad seminal fue similar en todas las líneas para el grupo de espermatozoides analizados, según los parámetros tomados para el análisis computarizado.

Cuadro XIII. Promedios y errores estándar de parámetros de motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides (Parámetros CASA) en tres líneas de ratones

	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s'</i>
P	29.65 ± 1.00 b	25.58 ± 0.31 c	38.71 ± 1.00 a
%MOT	56.87 ± 3.26 a	55.70 ± 3.87 a	51.96 ± 2.89 a
%PRO	18.35 ± 2.11 a	17.22 ± 1.61 a	18.78 ± 1.77 a
VAP	68.29 ± 3.81 a	65.68 ± 3.54 a	72.33 ± 3.74 a
Parámetros de vigor			
VCL	126.15 ± 9.43 a	120.48 ± 7.28 a	133.98 ± 6.70 a
ALH	9.29 ± 0.29 a	12.13 ± 2.86 a	9.69 ± 0.23 a
BCF	28.73 ± 0.78 a	28.85 ± 1.07 a	28.62 ± 0.88 a
Parámetros de progresividad			
VSL	45.54 ± 3.42 a	44.02 ± 2.23 a	47.71 ± 2.77 a
STR	66.39 ± 1.61 a	64.93 ± 1.85 a	65.04 ± 1.13 a
LIN	44.22 ± 1.60 a	39.13 ± 1.29 a	38.48 ± 1.11 a

P: peso. **%MOT**: porcentaje de mótils. **%PRO**: porcentaje de progresivos. **VAP**: velocidad en camino suavizado. **VCL**: velocidad en camino real. **ALH**: distancia promedio del desplazamiento de la cabeza. **BCF**: frecuencia de movimiento lateral de la cabeza **VSL**: velocidad en línea recta. **STR**: desviación de la velocidad promedio a la velocidad en línea recta. **LIN**: desviación de la velocidad del camino real a la velocidad en línea recta.

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, P<0.05

5. Discusión

El seguimiento de la gestación, desde el momento mismo de la ovulación y hasta la parición, evidenció diferencias significativas entre las tres líneas de ratones seleccionadas por peso, en el número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, y en el tamaño de camada a la primera parición.

El número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación estuvo relacionado directamente con el peso de la madre, no así el tamaño de camada. A lo largo del proceso de gestación las variables reproductivas observadas dependieron cada vez con menor intensidad del peso corporal de la hembra, relación que prácticamente desapareció al momento de la parición.

La relación entre tasa de ovulación y peso fue también observada en otras especies polítopas. En un trabajo con ratones, Lubritz y col. (1991) concluyeron que el peso de la hembra influyó sobre la tasa de ovulación; Ruiz Flores y Johnson (2001) llegaron a la misma conclusión al realizar un experimento con cerdos y Viudes de Castro y col. (1995) encontraron una mayor tasa de ovulación en los animales más pesados en un estudio comparativo entre líneas de conejos seleccionados por peso. También Argente y col. (1999) observaron un incremento de la tasa de ovulación al aumentar el peso de la coneja, pero a diferencia de los resultados expuestos en el presente trabajo, comprobaron un aumento en el número de gazapos nacidos al aumentar la tasa de ovulación.

Los resultados demostraron que las hembras de la línea testigo (**t**) a pesar de tener una tasa de ovulación, números de embriones y de sitios de implantación intermedios entre las líneas seleccionadas, lograron producir el mayor número de crías paridas. Esta mejor *performance* se debió a la incidencia de una baja proporción de pérdidas gestacionales. En el período comprendido entre la ovulación y la implantación de los embriones, las hembras más pesadas (**s'**) tuvieron el mejor rendimiento reproductivo. En una etapa posterior de la gestación, la ocurrencia de una mortalidad embrionaria elevada llevó a que estas hembras pararan un número de crías menor y alcanzaran una relación también menor entre el tamaño de camada y el peso, si bien no significativa, si se las compara con las hembras de la línea control. Situación que podría estar relacionada con una capacidad uterina limitada; las tasas en función del peso fueron similares en todas las líneas, como si hubiera un límite alrededor de 0,40 para el tamaño de camada por gramo de peso corporal, común a las tres líneas. Las hembras más livianas (**s**) se mantuvieron con los valores más bajos durante todo el proceso reproductivo evaluado.

Un mayor tamaño de camada no necesariamente es consecuencia de una mayor tasa de ovulación (hembras **s'**), tal como fue demostrado, también en ratones, pero al seleccionar por caracteres de fertilidad. Land y Falconer (1969) al practicar selección divergente para tasa de ovulación natural a lo largo de doce generaciones de ratones, observaron que el mayor tamaño de camada correspondió a la línea control, el menor a la línea seleccionada para alta tasa de ovulación natural y el intermedio a la línea de menor tasa de ovulación. Spitschak y col. (2007) observaron un mayor número de cuerpos lúteos, de óvulos, de

embriones preimplantacionales y de sitios de implantación en la línea seleccionada para alta fertilidad sin sincronización del celo con respecto a la línea control; pero en aquella también se observó un mayor número de óvulos o embriones degenerados o no desarrollados. La línea control tuvo su mayor tasa de mortalidad en el período posimplantacional y fue explicada por limitación de la capacidad uterina. Por el contrario, en la línea seleccionada para alta fertilidad el mayor porcentaje de pérdidas fue observado en el período anterior a la implantación y en este caso fue atribuida a una mayor ocurrencia de óvulos no competentes para la fertilización o con imposibilidades de conseguir su posterior desarrollo.

La eficiencia reproductiva similar de las líneas testigo (t) y seleccionada para bajo peso (s), indicó que en relación al número de oocitos ovulados, ambas líneas, paren un número igual de crías, y éste a su vez fue mayor que el calculado para las hembras seleccionadas para alto peso (s'). La baja eficiencia reproductiva de las hembras más pesadas, aún siendo las de mayor tasa de ovulación, puso nuevamente en evidencia una mayor ocurrencia de pérdidas embrionarias durante el transcurso de la preñez.

Las hembras seleccionadas para alto peso tuvieron un mayor porcentaje de pérdida relativa total al compararlas con las hembras de las otras dos líneas. Las hembras seleccionadas para bajo peso y las no seleccionadas tuvieron una proporción similar de pérdidas gestacionales totales. El análisis del momento en que ocurrieron las pérdidas evidenció estrategias diferentes. Las hembras no seleccionadas y las de bajo peso tuvieron la mayor proporción de mortalidad

embrionaria entre la ovulación y la fertilización (primera etapa: PRCL). En las hembras seleccionadas para alto peso, la mortalidad fue semejante en los dos primeros períodos de la gestación (PRCL y PRE) y, en el segundo y tercer período fue mayor que la observada en las otras dos líneas. Un porcentaje de mortalidad más alto en períodos avanzados de la gestación, incrementarían los costos biológicos necesarios para el mantenimiento de la preñez. Frente a esta situación, las líneas *t* y *s*, tuvieron una estrategia de menor costo, desde un comienzo redujeron el número de potenciales crías, quizás ajustándolo a la disponibilidad de recursos necesarios para llevar la mayor parte de ellos hasta el nacimiento. En ellas, las mayores pérdidas se dieron en un período temprano, luego, a medida que progresó la gestación, la mortalidad fue siendo menor.

En dos líneas de ratones seleccionadas para alto y bajo tamaño de camada a la primera parición, Holt y col. (2004) encontraron una proporción más alta de mortalidad en las hembras de selección positiva al compararla con la de selección negativa y con la control. Desde la ovulación hasta el nacimiento, hubo un 34% de mortalidad embrionaria en la línea de selección positiva contra un 31% en la línea control. Al día 8 de preñez ambas líneas presentaron cerca de un 10% de pérdidas, entre el día 8 y 16 el porcentaje fue algo más bajo que en el período anterior y similar para las dos líneas. Desde el día 16 al 21, las pérdidas fueron del 17% en la línea seleccionada para alto tamaño de camada y del 12% en la control.

Cuando las hembras de las tres líneas se superovularon, se incrementó la tasa de ovulación natural, el número de embriones y de sitios de implantación.

Cada una de las líneas mostró el mismo comportamiento que el descrito bajo condiciones normales: la línea *t* mantuvo la mejor *performance* reproductiva, puesto que partiendo de un número intermedio de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación alcanzó el mejor tamaño de camada, y en el lugar opuesto se encontró la línea *s'*. Las diferencias en las tasas del tamaño de camada en función del peso ($TC/P_t=0,49$ y $TC/P_{s'}=0,33$) contradicen la hipótesis planteada anteriormente sobre limitaciones de la capacidad uterina y la existencia de un máximo en 0,40.

El tratamiento permitió homogeneizar la respuesta de las líneas seleccionadas, en relación a la tasa de ovulación y a los potenciales embriones disponibles en los oviductos, pero a partir de la implantación las hembras de estas líneas fueron más heterogéneas si se las compara con las de la línea no seleccionada.

A pesar de que el peso corporal demostró ser un carácter que afectó el proceso reproductivo estudiado, al superovular, la dependencia con el peso de la hembra se anuló antes del momento indicado para las hembras evaluadas en condiciones normales. Esta independencia del peso se observó a partir del momento de la implantación y fue consecuencia de un incremento de las pérdidas en una etapa más temprana de la gestación.

En las tres líneas de ratones, la administración de gonadotrofinas para estimular la función ovárica incrementó las pérdidas totales ocurridas a lo largo de la gestación. Si la mortalidad se analiza por etapas y se compara con lo ocurrido en las hembras sin estimular, se desprende que las pérdidas relativas de

cuerpos lúteos disminuyeron prácticamente a la mitad, pero a la vez aumentaron las pérdidas relativas de embriones y de fetos. De lo anterior se deduce que un efecto negativo importante de la superovulación, en las tres líneas de ratones, fue el incremento de las pérdidas gestacionales totales. Mechaisen y col. (2005) al utilizar gonadotrofinas en dos líneas de conejos seleccionados por tamaño de camada y por tasa de crecimiento, observaron que si bien se incrementó la tasa de ovulación no se evidenciaron diferencias significativas en el número de embriones desarrollados *in vivo* y postvitricación.

La incidencia de una mortalidad embrionaria mayor debida al uso de gonadotrofinas para estimular la función ovárica también fue demostrada en animales de distintas especies sobre los que no se practicó selección artificial. Además se describieron causas posibles de la ocurrencia de dicha mortalidad. Elmazar y col. (1989) observaron que en embriones tempranos (día 3 de la gestación) obtenidos de hembras superovuladas, el número de células que lo conformaban era menor si se los comparaba con los obtenidos de hembras control. No obstante, los embriones de hembras superovuladas transferidos a hembras control pseudopreñadas indicaron que el desarrollo embrionario anormal encontrado después de la superovulación con gonadotrofinas se debió fundamentalmente a los efectos de éstas sobre el medio ambiente uterino de la madre.

Van de Auwera y D'Hooghe (2001) demostraron que la superovulación en ratones causa un deterioro en el desarrollo embrionario *in vitro* e *in vivo*, un incremento de blastocistos con formación anormal, un pronunciado retardo en el

crecimiento fetal, y un incremento en el número de resorciones de los sitios de implantación. Los autores sostienen que tales efectos pueden explicarse por un deterioro en la calidad de los oocitos, por una influencia negativa del medio ambiente uterino sobre el desarrollo embrionario y por una baja receptividad endometrial.

Ertzeid y Storeng (2001) observaron que la tasa de implantación al día 5 de gestación en ratones fue mayor para embriones obtenidos de hembras superovuladas y transferidos a úteros de hembras control que los recibidos en úteros de hembras superovuladas. Por otro lado, la menor tasa de implantación se dio en embriones de donadoras control transferidos a receptoras estimuladas, poniéndose de manifiesto que el medio uterino estimulado tiene influencias negativas sobre la capacidad de implantación incrementado la mortalidad luego de la implantación.

Sibug y col. (2002) relacionaron las desventajas observadas durante el período de implantación embrionaria con la reducción de la expresión de un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF₁₂₀) considerado el más potente como estimulador de la angiogénesis durante ese período. Esto conlleva una reducción en el tamaño de los sitios de implantación (día 5 y 6) y prolonga el período gestacional al trabajar con ratones. La expresión del factor mencionado está asociada al proceso de implantación, en la aposición del blastocisto con el epitelio endometrial, estadio inicial de la implantación que coincide con un incremento de la permeabilidad vascular y con un amplio crecimiento de vasos

sanguíneos en el endometrio. Esto último coincide con lo comunicado por otros autores al trabajar con ratas superovuladas (Rabbani y Rogers, 2001).

Nissen y col. (2000) concluyeron que el control de la ovulación en cerdas por gonadotrofinas reveló una marcada diversidad de estadios de desarrollo (de 1 a 4 células) en los embriones recolectados veinticuatro horas posteriores al apareamiento, esta disparidad incidió directamente sobre el momento de implantación de los mismos y la efectividad de dicho proceso.

Videla y Wüst (1998) utilizaron gonadotrofinas para inducir celos posdestete en hembras multíparas y como resultado obtuvieron un acortamiento del intervalo destete servicio y una mejora en el porcentaje de retención de servicio, pero la ausencia de diferencias en los parámetros lechones nacidos y peso al nacimiento, indicaron que el tratamiento no incrementó el número de lechones a la parición, bajo las condiciones del ensayo realizado.

Ford y col. (2002) estudiaron la capacidad uterina en cerdos tomando dos efectos: el medioambiente uterino y el genotipo del feto. Observaron que el número de embriones puede incrementarse experimentalmente (a los 30 días) usando superovulación y superinducción; sin embargo, la lechigada de estas hembras tuvieron un número similar de cerdos al compararlas con las hembras control. Lo cual demostró que entre el día 30 y la parición hubo un período de pérdidas fetales significativo. Los autores concluyeron que para lograr un buen tamaño de camada el principal factor es controlar la mortalidad embrionaria que pueda acontecer durante la gestación, más importante aún que el número de embriones viables disponibles en el oviducto.

Las hembras de la línea de selección negativa fueron, en relación a su peso, las que respondieron mejor a la superovulación mostrando mayores índices relativos de cuerpos lúteos, embriones, sitios de implantación y tamaño de camada. Es decir, que las hembras *s* al ser superestimuladas lograron una mayor tasa de ovulación, un mayor número de embriones implantados y un mayor número de ellos se desarrollaron y fueron paridos por cada gramo de peso corporal de la madre. Esta situación favorable no fue suficiente para superar a las otras dos líneas, puesto que, como se dijo anteriormente las hembras de menor peso tuvieron valores significativamente más bajos de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación al compararlas con las hembras de mayor peso y con las hembras que no fueron seleccionadas.

Los resultados obtenidos corresponden a la administración de una dosis fija de 5 U.I. por hembra, no habiendo variado la dosis en función del peso. La opción elegida fue reconocida como óptima y utilizada por diversos investigadores (Elmazar y col., 1989; Van de Auwera y D'Hooghe, 2001; Ertzeid y Storeng, 2001; Sibug y col., 2002). En este sentido, Fowler y Edwards (1960) al probar diferentes dosis de gonadotrofinas, desde 0.25 a 6 U.I., en ratones con selección divergente de peso, demostraron que el número de óvulos producidos con cada dosis fue independiente del peso. Por otra parte, Byers y col. (2005) al evaluar la eficiencia de la estimulación ovárica en veintiocho cepas diferentes de ratones, demostraron que la respuesta a la superovulación depende de la propia cepa (genotipo) que se utilice para desarrollar la investigación.

La eficiencia reproductiva de las hembras superovuladas, para las tres líneas, fue menor al compararlas con las hembras sin estimulación ovárica, y la línea seleccionada para alto peso, en ambos grupos, fue la de menor eficiencia reproductiva al calcular el número de embriones, sitios de implantación y crías nacidas en relación a la tasa de ovulación (CL).

En general, analizando las variables observadas para cada línea y tanto en el grupo de hembras evaluadas en condiciones normales como bajo los efectos de gonadotrofinas exógenas, se observó que las hembras de la línea no seleccionada tuvieron una mejor *performance* reproductiva. Con una posición intermedia entre las dos líneas seleccionadas para número de cuerpos lúteos, embriones y sitios de implantación, fue más eficiente al parir un mayor número de crías debido a la ocurrencia de un menor porcentaje de pérdidas gestacionales, todo esto, con un peso también intermedio al compararlas con las seleccionadas y con menores coeficientes de variación que la convierten en la línea más estable y por lo tanto más predecible.

La aptitud de un individuo es el resultado de una serie de procesos fisiológicos y de desarrollo. Uno de sus componentes fundamentales es el número de crías nacidas como parámetro de fertilidad. A su vez, el tamaño de camada incluye la tasa de ovulación y la sobrevivencia de los embriones. Por lo tanto, las hembras que tuvieran los valores más altos para la tasa de ovulación y los recursos energéticos suficientes para que el mayor número de óvulos pudieran convertirse en crías nacidas vivas, alcanzarían mayores valores de la aptitud biológica (Falconer, 1986). Según los resultados del presente trabajo, los valores

más altos para número de óvulos, embriones y sitios de implantación correspondieron a las hembras más pesadas (línea *s'*) siendo hasta aquí, las de mayor potencial reproductivo. Sin embargo, la alta incidencia de mortalidad embrionaria, llevó a que la mayoría de los embriones no fueran paridos, pasando a tener las hembras de la línea *t* una mayor aptitud, medida como tamaño de camada al nacimiento, debido a una mayor eficiencia reproductiva (TC/CL). Probablemente la selección realizada, en *s'*, derivó una mayor proporción de los recursos disponibles para mantener el carácter bajo selección, resintiendo la disponibilidad de los mismos para otras funciones vitales, como lo es el desarrollo gestacional de las crías. Las hembras *t* probablemente reparten equitativamente sus recursos entre las distintas funciones vitales, de modo que su fertilidad (número de crías paridas) no se ve afectada.

En machos, las líneas se diferenciaron entre sí y en la misma dirección de la selección practicada en el peso de los testículos, el espesor del epitelio seminífero y el número de espermatozoides producidos.

La relación positiva encontrada entre el peso de ambos testículos con el carácter seleccionado (P) y con el número de espermatozoides de los machos de las tres líneas, permite decir que los testículos de mayor peso fueron los de los animales más pesados (*s'*) y, a su vez, en aquellos se observó un epitelio seminífero significativamente más alto, lo que redundó en un mayor número de espermatozoides/mililitro de semen si se los compara con las otras líneas. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas al evaluar el porcentaje de espermatozoides anormales. Rodríguez-Martínez y col. (2000), sostienen que el

estudio de la morfología espermática no muestra relación directa con la fertilidad pero permite identificar reproductores con baja calidad, con lo cual se descartarían por ejemplo, como donantes en programas de inseminación artificial. Si bien los resultados obtenidos no evidenciaron diferencias significativas entre las líneas al comparar el porcentaje de espermatozoides anormales, los valores calculados para cada línea fueron más bajos que los comunicados para otras cepas de ratones (Sobarzo y col., 2000; Kawai y col., 2006).

En cuanto a la calidad seminal, los parámetros de motilidad, progresión y vigor de los espermatozoides, bajo las condiciones del *setup* utilizado para este trabajo (ver Anexo) fueron similares para los machos de las tres líneas, por lo tanto, la calidad del semen no aporta a la explicación de las diferencias de fertilidad de estas líneas. Según algunos autores, en ciertos animales de interés económico, por ejemplo el cerdo, la movilidad individual de los espermatozoides da cuenta de la funcionalidad del semen y es utilizado como un indicador de la capacidad fertilizadora *in vivo* de una determinada muestra de semen (Tardif y col., 1999; Katebi y col, 2005).

Otra consideración a realizar se refiere al *setup* elegido. Según se desprende del Anexo II, se ha analizado un conjunto de espermatozoides por ratón que cumplieron con determinadas condiciones (por ejemplo, más de 25 μm para VAP, 50% como mínimo para STR) y que pueden considerarse como un conjunto de espermatozoides con una calidad seminal superior. Cabe preguntarse si modificando los umbrales para cada uno de los parámetros, se

encontrarían diferencias en la calidad seminal del resto de los espermatozoides que no cumplen con las especificaciones utilizadas.

Los machos seleccionados para alto peso podrían considerarse como los de mejor *performance* reproductiva ya que, si bien las tres líneas tienen la misma calidad seminal, éstos poseen un número significativamente mayor de espermatozoides, aumentando las posibilidades de concretar eficientemente la tarea de fecundar al óvulo.

Tal como fuera observado en trabajos anteriores (Bernardi y col., 1999 y 2007; Oyarzabal y Rabasa, 1999; Oyarzabal, 2003), la selección continua a largo plazo de un carácter de interés productivo (peso) ocasionó un deterioro de la fertilidad de las líneas. La mejor *performance* reproductiva se observó en los animales no seleccionados, con una muy buena adaptación al ambiente en el cual se crían, de peso intermedio y sin reproducción asistida. Esta relación reproducción-producción se vuelve especialmente importante, en algunas especies (cerdos y conejos), en las que una característica reproductiva puede ser a la vez una característica productiva.

Podría ser que el proceso de selección, practicado por un largo período de tiempo, provocara el desbalance de los genotipos en el sentido siguiente: cada individuo tiene un paquete finito de recursos disponibles (alimento, reservas corporales) que distribuye en mantenimiento, crecimiento, movimiento, reproducción, respuestas inmunológicas, estrés. El incremento de peso por selección artificial pudo demandar una mayor proporción de esos recursos, afectando la distribución de los mismos en el resto de las funciones vitales y, en

primer lugar la fertilidad (Dunnington, 1990; Beiharz y col., 1993). Esto también se reflejó en la disminución de la homogeneidad de las respuestas de las líneas seleccionadas al compararlas con las de la línea no seleccionada. Aquellas, entonces, fueron más inestables (coeficientes de variación mayores), es decir que la selección a largo plazo llevó a desestabilizar la respuesta en estos animales.

Los resultados expuestos permitieron concluir que la selección direccional para un carácter de interés productivo (peso), practicada a largo plazo, y la estimulación ovárica son dos factores que modificaron el potencial reproductivo, la capacidad embrionaria y las estrategias de las líneas en cuanto al momento en que ocurren las mayores pérdidas gestacionales. No se ha observado, con las restricciones planteadas, una diferenciación en la calidad seminal de los machos de estas líneas, pero sí modificaciones en la cantidad de sus espermatozoides.

6. Bibliografía

- American Veterinary Medical Association. 2007. AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA. Panel on Euthanasia).
- Antonini, A. G. 2007. Estrategia genética de producción, aptitud biológica y objetivos de selección en conejos para carne. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- Argente, M. J.; Santacreu, M. A.; Climent, A.; Bolet, G.; Blasco, A. 1999. Divergent Selection for Uterine Capacity in Rabbits. *J. Anim. Sci.* 75: 2350-2354.
- Beilharz, R.G.; Luxford, B.G. and Wilkinson, J.L. 1993. Quantitative genetics and evolution: Is our understanding of genetics sufficient to explain evolution?. *J. Anim. Breed. Genet.* 110/3: 161-170.
- Benavides, F. J. y Guénet, J. L. 2003. La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio. En: Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Coord. de Ed. Universidad de Alcalá. Madrid. España. pp. 228-229.
- Bernardi, S.; Brogliatti, G.; Oyarzabal, M. I. 1999. Diferencias de fertilidad en ratones seleccionados por peso. *Analecta Veterinaria* 19, 1/2: 11-17.

- Bernardi, S.; Brogliatti, G.; Oyarzabal, M. I. 2007. Ovarian structure in mice lines selected for weight. *Anatomía, Histología, Embryología. Journal of Veterinary Medicine*. Enviado en diciembre 2007.
- Bradford, G. E. 1971. Growth and reproduction in mice selected for rapid body weight gain. *Genetics* 69: 499-512.
- Brien, F. D. 1986. A Review of the Genetic and Physiological Relationships Between Growth and Reproduction in Mammals. *Anim. Breed. Genet.* Vol. 54, N° 12: 975-997.
- Bünger, L.; Renne, U. and Dietl, G. 1992: Selection for body weight at 42 days in laboratory mice with and without litter size standardization. Direct response and correlated effects on litter size. *Arch Tierz Dummerstorf* 35, 305-319
- Bustos Obregón, E.; Riveros, J. L.; Maurer, I. 2005. Función Espermatocítica Post-Hipoxia Simulada en Ratón. *Ciencia y Trabajo. Chile. Año 7. 16: 56-60.*
- N inbred mouse strains follo
- Byers, S. L.; Payson, S. J.; Taft, R. A. 2005. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology*. Vol. 65. N°9: 1716-1726.
- Cancel, A. M.; Lobdell, D.; Mendola, P.; Perreault, D. 2000. Objective evaluation using assisted reproductive technology. *Human Reprod.* Vol. 15. N° 6: 1322-1328.
- Chia, R.; Achilli, F.; Festing, M. F. W.; Fisher, E. M. C. 2005. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet.* 37: 1181-1186.

- Day, B. N.; Longenecker, D. E.; Jaffe, S. C. 1967. Fertility of swine following superovulation. *J Anim Sci.* 26: 777-780.
- De la Cruz Ramirez, W. F.; Luján Mavila, K. M.; Miranda Soberón, U. E. 2004. Efectos del malathion sobre la espermatogénesis de ratones machos jóvenes de la cepa BALB-C53. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional "San Luis Gonzaga". Ciudad de Ica.
- Domenichini, M.; Picardi, L.; Rabasa, S. L. 1989. Depresión de la aptitud por selección en ratones con endocría. *Mendeliana* 9 (1): 57-66.
- Dunnington, E. A. 1990. Selection and homeostasis. 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Edinburgh, July 23-27.
- Elmazar, M. M. A.; Vogel, R.; Spielmann, H. 1989. Maternal factors influencing development of embryos from mice superovulated with gonadotrophins. Abstract. *Reprod Toxicol.* 3 (2): 135-138.
- Ertzeid, G. and Stoteng, R. 2001. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reprod.* Vol. 16. Nº 2: 221-225.
- Falconer, D. S. 1986. Los caracteres métricos bajo selección natural. En: *Introducción a la Genética Cuantitativa.* 2º Edición. Compañía Editorial Continental, S.A. de C. V., México. pp: 341-358.
- Feldman, E. C. and R. W. Nelson. 1996. *Endocrinología y reproducción canina y felina.* Ed. Intermédica.

- Ford, S. P.; Vonnahme, K.A.; Wilson, M.E. 2002. Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. *J. Anim. Sci.* 80 (E. Suppl. 1): E66-E73.
- Fowler, R. E.; Edwards, R. G. 1960. The fertility of mice selected for large or small body size. *Genet. Res., Camb.* 1: 393-407.
- Fuentes Cintra, M.; Pérez García, L.; Suárez Hernández, Y.; Soca Pérez, M. 2006. Características reproductivas de la cerda. Influencia de algunos factores ambientales y nutricionales. *Revista electrónica de veterinaria REDVET.* www.veterinaria.org/revistas/redvet. Vol.11. N°1.
- Guzmán, L.; López, R.; Llerena, G.; Pino, J.; Retuerto, F. 2005. Recuperación del epitelio germinal masculino de ratones tratados con dosis única de Busulfán. *Rev. Peru. Biol.* Vol. 12. N° 1: 141-144.
- Hamilton Thorne Biosciences. 2002. *HTM-IVOS Software Guide.* Version 12.1
- Hermesch, S.; Luxford, B. G.; Graser, H. U. 2000. Genetic parameters for lean meat yield, meat quality, reproduction and feed efficiency traits for Australian pigs 3. Genetic parameters for reproduction traits and genetic correlations with production, carcass and meat quality traits. *Livest. Prod. Sci.* Vol. 65. N°3: 261-270.
- Holt, M.; Vangen, O.; Farstad, W. 2004. Components of litter size in mice after 110 generations of selection. *Reproduction.* 127: 587-592.

Institute of Laboratory animal Resources. Commission on life sciences. Natural research council. 1996. Guide for the Care and use of laboratory animals. National Academy Press. Wasnigton, D. C.

Katebi, M.; Movahedin, M.; Abdolvahabi, M. A.; Akbari, M.; Abolhassani, F.; Sobhani, A.; Aoki, F. 2005. Changes in Motiliy parameters of Mouse Spermatozoa in Response to Different Doses of Progesterone during Couse of Hyperativation. Iran. Biomed. J. Vol. 9. N° 2: 73-79.

Kato, M.; Fukunishi, K.; Ikegawa, S.; Higuchi, H.; Sato, M.; Horimoto, M.; Ito, S. 2001. Overview of studies on rat sperm motion analysis using a Hamilton-Thorne sperm analyzer. Collaborative working study. J. Toxicol. Sci. Vol. 26. N° 5: 285-297.

Kawai, Y.; Hata, T.; Suzuki, O.; Matsuda, J. 2006. The Relationship between Sperm Morphology and *In Vitro* Fertilization Ability in Mice. J. Reprod. Dev. Vol. 52. N° 4: 561-568.

Land, R. B. 1970. Genetic and phenotypic relationships between ovulation rate and body weight in the mouse. Genet. Res. Camb. 15: 171-182.

Land, R. B. and Falconer, D. S. 1969. Genetic studies of ovulation rate in the mouse. Genet. Res., Camb. 13: 25-46.

Lubritz, D. C.; Eisen, E. J.; Robison O. W. 1991. Effect of selection for litter size and body weight on hormone induced ovulation rate in mice. J. Anim. Sci. 69: 4299-4305.

- Lucy, M. C. 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Hill It End? *J Dairy Sci* 84:1277-1293.
- Luxefahr, S. D.; Odi, H. B.; Atakora, J. K. A. 1996. Mass Selection For 70-Day Body Weight in Rabbits. *J. Anim. Sci.* 74: 1481-1489.
- Marini, P.R. y Oyarzabal, M.I. 2002. Patrones de producción en vacas lecheras. I Componentes de la producción y sus características según categorías de producción. *Rev. Arg. Prod. Anim.*, vol. 22, nº 1: 29-46. ISSN 0326-0550.
- McKiernan, S. H. and Bavister, B. D. 1998. Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one-cell hamster embryos. *Human Reprod.* Vol.13. Nº3: 724-729.
- Mehaisen, G. M.; Vicente, J. S.; Lavara, R.; Viudes de Castro, M. P. 2005. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 90 (1-2): 175-184.
- Miller, B. G. and Armstrong D. T. 1981. Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. *Biol. Reprod.* 25: 253-260.
- Nissen, A. K.; Schmidt, M.; Hyttel, P.; Greve, T. 2000. Ovulation and embryonic development rate following hCG-stimulation sows. *Acta Vet Scand.* Vol. 41 Nº 3: 321-328.
- Oltenacu, P. A.; Frick, A.; Lindhé, B. 1990. Relationship of Fertility to Milk Yield in Swedish Cattle. *J Dairy Sci* 74: 264-268.

- Oyarzabal, M. I. y S. L. Rabasa. 1995. Selección divergente de peso en ratones con alta endocría seguida de 90 generaciones de cría libre. *Mendeliana* 10, 119-132.
- Oyarzabal, M.I. y Rabasa, S.A. 1999. Riqueza genética y estabilidad en ratones de la cepa CF1. *Mendeliana* 13 (2): 74-84.
- Oyarzabal, M. I. 2003. Effects of long term individual selection on population in mice. IX World Conference on Animal Production. Porto Alegre, Brasil. Editado en C.D.
- Palma, G. A. 2008a. Biotecnología de la Reproducción. Ciencia, Tecnología y Sociedad. En: Biotecnología de la reproducción. 2ª ed. ReproBiotec. pp.1-8.
- Palma, G. A. 2008b. Producción *in vitro* de embriones bovinos. En: Biotecnología de la reproducción. 2ª ed. ReproBiotec. pp.337-340.
- Rabbani, M. M. and Rogers, P. A. 2001. Role of vascular endotelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction*. 122: 85-90.
- Rauw, W. M.; Kanis, E.; Noordhuizen-Stassen, E. N.; Grommers, F. J. 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest. Prod. Sci.* 56: 15-33.
- Roberts, R. C. 1961. The lifetime growth and reproduction of selected strains of mice. *Heredity*, 16: 369-381.

- Roberts, R. C. 1965. Some contributions of the laboratory mouse to animal breeding research. Part I. *Animal Breeding Abstracts*. Vol. 33. N°3: 339-353.
- Rodriguez Martinez, H. y Ericsson, B. 2000. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad en inseminación artificial en cerdos. III Simposio Internacional MINITB. Flores da Cunha –RS- Brasil. 1: 11-33.
- Royal, M.; Mann, G. E.; Flint, P. F. 2000. Strategies for Reversing the Trend Towards Subfertility in Dairy Cattle. *The Veterinary Journal* 160: 53-60.
- Ruiz-Flores, A. and Johnson, R. K. 2001. Direct and correlated responses to two-stage selection for ovulation rate and number of fully formed pigs at birth in swine. *J. Anim. Sci.* 79: 2286-2297.
- Rydhmer, L. 2000. Genetics of sow reproduction, including puberty, oestrus, pregnancy, farrowing and lactation. *Livest. Prod. Sci.* 66: 1-12.
- Sibug, R. M.; Helmerhorst, F. M.; Tijssen, A.M.I.; Kloet, E. R.; Koning, J. de. 2002. Gonadotrophin stimulation reduces VEGF₁₂₀ expression in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Human Reprod.* Vol. 17. N° 6: 1643-1648.
- Sobarzo, C. and Bustos-Obregón. 2000. Sperm quality in mice acutely treated with parathion. *Asian J Androl* 2: 147-150.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. 1979. *Biometría*. H. Blume Ed. Madrid.
- Solorio López, J. S.; Villa Godoy, A.; González Padilla, E.; Olea Pérez, R.; Vera Ávila, H. 2002. Uso de dos esquemas de aplicación de gonadotropinas en

cerdas sometidas a destete en el día diez posparto: efecto en la eficiencia y funciones reproductivas. *Veterinaria México*. Vol.33. N° 003: 219-235.

Spearow, J. L. and Barkley, M. 1999a. Genetic Control of Hormone-Induced Ovulation Rate in Mice. *Biol Reprod*. 61: 851-856.

Spearow, J.; Nutson, P.; Mailliard, W.; Porter, M.; Barkley, M. 1999b. Mapping Genes That Control Hormone-Induced Ovulation Rate in Mice. *Biol Reprod*. 61: 857-872.

Spitschack, M.; Langhammer, M.; Schneider, F.; Renne, U.; Vanselow, J. 2007. Two high-fertility mouse lines show differences in component fertility traits after long-term selection. *Reprod Fertil Dev*. 19: 815-821.

Stachecki, J. J.; Ginsburg, K. A.; Leach, R. E.; Armant, R. D. 1993. Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) of Epididymal Sperm from the Domestic Cat. *J Androl*. Vol. 14: 60-65.

Tain, C. F.; Goh, V. H.; Ng, S. C. 2000. Effect of hyperstimulation with gonadotrophins and age of females on oocytes and their metaphase II status in rats. *Mol. Reprod. Dev*. 55: 104-108.

ten Napel, J. and Johnson, R. 1997. Genetics Relationships Among Production Traits and Rebreeding Performance. *J. Anim. Sci*. 75: 51-60.

Tardiff, S.; Laforest, J. P.; Cormier, N.; Bailey, J. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52: 447-459.

Van der Auwera, I. and D'Hooghe, T. 2001. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reprod.* Vol. 16. Nº 6: 1237-1241.

Videla Dorna, I. y Wüst, A. 1998. Uso de las gonadotrofinas exógenas en el manejo reproductivo de cerdas multíparas y nulíparas. *Rev. Arg. de Prod. Anim.* Vol. 18. Nº1: 335-356.

Viudes de Castro, M. P.; García-Ximénez, F.; Vicente, J.S. 1995. Investigación Agraria. Vol 10: 145-151.

von Barkemeyer, H.; Horst, P.; Schlote, W. 1989. Antagonismus zwischen Wachstum und FitneB bei der Maus als Folge langfristiger divergenter Selektion für Proteinansatz. *J. Anim. Breed. Genet.* 106: 433-442.

7. Anexos

7.1. Anexo I

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Ovarian structure in mice lines selected for weight

S. F. Bernardi^a, G. Brogliatti^b and M. I. Oyarzabal^{c*}

Addresses of authors: ^a Cátedra de Histología I y Embriología Básica. Fac. Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Ov. Lagos y Ruta 33. 2170 Casilda. Argentina. ^b Centro Genético Bovino EOLIA S.A. Paraná 1097 10 "A". 1018 Buenos Aires. Argentina. ^c Cátedra de Producción Animal II. Fac. Cs. Veterinarias y Consejo de Investigaciones, Universidad Nacional de Rosario. Ov. Lagos y Ruta 33. 2170 Casilda. Argentina. *Corresponding author: Telephone/fax (054) 03464 422050; e-mail: moyarzab@fveter.unr.edu.ar.

With 1 figure and 4 tables.

Summary

Selection for body weight at 49 d of age (**s** and **h**, downward selected lines; **s'** and **h'**, upward selected lines) affected reproductive traits in CF1 mice lines. The objective of the present study was to compare ovarian structures in females of these lines, as well as in unselected controls (Line **t**). The number of ovarian follicles (N), follicle diameter (FD), number of corpora lutea (CL), litter size (LS), and body weight (W), were recorded. There were significant differences among lines for N, FD, CL, LS and W; means for the lines with the greatest difference for post-pubertal females were: $N_s = 19.3$ and $N_{s'} = 32.7$; $FD_{h'} = 161.7$ and $FD_{s'} = 178.2$; $CL_h = 10.3$ and $CL_{s'} = 21.9$; $LS_s = 6.0$ and $LS_{h'} = 11.1$; $W_h = 18.9$ and $W_{s'} = 32.4$. There were also differences between positive lines; Line **s'** had a higher proportion of large follicles in prepubertal females, a greater capacity to convert these follicles into CL, but a lower capacity to maintain embryos until term than Line **h'**. For negative lines, Line **h** apparently had a reduced incidence of embryonic loss when it was compared with Line **s**. In conclusion, selection for body weight modified ovarian structure, as well as reproductive efficiency.

Introduction

Response to selection for economically important traits can produce correlated responses in other characteristics. In broilers, turkeys, pigs, and dairy cattle, continuous directional selection increased production (Rauw et al., 1998); however, animals selected for high production efficiency had deleterious correlated responses in other traits, including impaired reproductive and

immunologic functions (Rauw et al., 1998). Female mice selected for high body weight had significantly shorter reproductive life, increased inter-parturition interval, smaller litter size, and fewer offspring weaned (relative to females in an unselected group) (Roberts, 1961). In two lines of inbred mice, two-way selection for weight significantly reduced fertility, survival, and production (Domenichini et al., 1989). Furthermore, litter size was reduced in outbred mice selected for high body weight at 42 d of age (Bünger et al., 1992).

At the Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, starting in 1986, a two-way selection for body weight at 49 d of age was conducted in two pairs of lines of mice (downward selected lines, **s** and **h**; and upward selected lines, **s'** and **h'**). The response to selection for body weight included changes in fertility. The unselected control line (**t**) was the most stable population, with the best biological fitness and medium body weight; female mice from this line had the most consistent production, including the shortest interval between litters, more litters, and no reduction in litter size with successive litters (Oyarzabal and Rabasa, 1995, 1999). Although the duration of the estrous cycle was not significantly different among lines, there were significant differences in age at vaginal opening (marker of onset of puberty) (Bernardi et al., 1999).

Based on the previous results, our objective was to determine if selection for body weight in these mice modified ovarian follicular development and ovulation. Therefore, we assessed the number and size of ovarian follicles, the number of CL, and their association to body weight and other end points of fertility (up to the first parturition).

Materials and methods

Selected lines

We started with mice from a random-bred population (CF1 strain), with $N_e \cong 80$, a control population **t** without selection and with an effective number $N_e \cong 40$. Two line pairs of two-way selection for body weight at 49 d of age (**s** and **h**, downward selected lines; and **s'** and **h'**, upward selected lines) were founded from control mice **t**, drawn from Generation 3 for **s** and **s'** and from Generation 8 for **h** and **h'** (Oyarzabal and Rabasa, 1995, 1999). When the present study was conducted, Generations 40 and 35, respectively, were breeding. Inbreeding was performed by limiting population size ($N_e \cong 12$), including full-sib mating in the first generation of **h** and **h'** lines, but not in the **s** and **s'** lines. Selection of individuals was based on choosing the heaviest or the lightest animals (at 49 d) in the respective lines.

Mice were kept under conventional conditions with food and water *ad libitum*. A standard laboratory diet (Cargill) was provided. They were maintained at an average temperature of $22^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$.

Ovarian follicle number and diameter

To compare the ovarian structure of the five line females, taking into account the degree of sexual maturity (pre- and post-puberty), on average, 10 females per line and degree of sexual maturity were used. Females were euthanized by cervical dislocation and both ovaries were removed. For adult females only, the stage of the estrous cycle (exfoliative vaginal cytology (Feldman and Nelson, 1991)) was determined at ovary removal.

The ovaries were fixed by immersion in 10% formaldehyde (pH, 7.4; buffered with anhydrous bisodium phosphate and monohydrated monosodium phosphate). Peri-ovarian fat was removed, the tissues were dehydrated and embedded in paraffin, and nine sections (5 µm thick) were obtained and stained with hematoxylin and eosin (Luna, 1987). Using bright-field microscopy (100X) ovarian follicle number and size (observed with a micrometre scale in the microscope) were determined.

Number of CL

On average, 12 females per line were used to determine the number of CL. They were exposed to males in a 3 ♀ : 1 ♂ ratio and were euthanized by cervical dislocation between 48 and 72 h later. A stereomicroscope (40 X) was used to examine ovarian structures.

Variables studied

- Number of ovarian follicles per female (N): mean number of follicles per section (nine sections for each ovary).
- Follicle diameter (FD): average diameter of follicles (from all nine sections of both ovaries).
- CL: number of CL per female (combined for both ovaries).
- Coefficient of fertility (CF): $CF = (7 \times LS)/(D + 21)$, where LS was litter size at birth and D was the interval from the service beginning to first parturition (Rabasa and Font, 1963). The CF of the contemporaries of the females used in this study was determined.

- Body weight (W): for adult females, weight at 49 d. For pre-pubertal females, the weight of the contemporaries of the females used in this study was determined.

Statistical analysis

Assuming a relatively normal distribution and approximately equal variance, paired Student's t-tests ($P < 0.05$) were done (within each line) to determine if there were significant differences between the left and right ovaries for follicle number, follicle diameter, or number of CL. In adult females, Student's t-tests ($P < 0.05$) were used to detect differences in follicle number and diameter according to the stage of the estrous cycle (estrus versus diestrus).

Within degree of sexual maturity, ovarian follicles were categorized on the basis of size (small, medium and large, corresponding to diameters of 40 to 180, 181 to 280, or $>280 \mu\text{m}$) and the percentage follicles in each size group (as a proportion of total number for all females) was determined. For each female, an arc sine transformation was applied on the proportions of ovarian follicles per size and one-way ANOVA were used to prove if there were significant differences between lines within each size group and degree of sexual maturity.

Differences among lines for N, FD, CL, LS, CF and W were detected with one-way ANOVA. The same analysis was used to compare, among lines, CL per gram of body weight (for each female). For ANOVA, differences between line means were identified with a Tukey-Kramer HSD test. Linear regression coefficients of the dependent variables N, FD, and CL, on W (independent variable), were calculated; the same analysis was done for CL (dependent variable) on CF and

on LS (independent variables). All analyses used JMP, Version 5.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

The number and diameter of ovarian follicles, and the number of CL were not significantly affected by side of ovary, nor by the stage of cycle (estrus versus diestrus) in adult females ($P > 0.05$). Therefore, total follicles and CL (combined for both ovaries) were reported and all pubertal females were considered (without regard to stage of cycle).

For all five lines, small follicles were most abundant; according to the degree of sexual maturity, the percentage of small follicles was higher in prepubertal versus pubertal females. Furthermore, in these two groups, large follicles accounted for $< 5\%$, versus $\sim 19\%$ of the total number of follicles. However, in Line *s'*, the proportion of follicles that were large was similar in both prepubertal and pubertal females (17 and 21%, respectively) (Table 1). Lines differed in the arc sine of the proportions of ovarian follicles for all sizes in prepubertal mice ($P < 0.05$) and for medium follicles in pubertal females (Tables 2 and 3).

Also, lines differed in the other variables studied (Tables 2 to 4). In general, it can be said that Line *t* had medium values for N, FD and CL. It was noteworthy that Line *s'* had the highest total number of ovarian follicles (in both prepubertal and pubertal females), the highest number of medium and large follicles in prepubertal females and so the largest diameter of ovarian follicles, the highest CL (not significantly different from Line *h'*), as well as the greatest body weight

at 49 d of age. Conversely, the other line of positive selection (Line **h'**) did not differ from the other lines in number and diameter of ovarian follicles in pre-pubertal and pubertal females, and number of CL, had the highest litter size and higher coefficient of fertility, although it had greater body weight.

For lines of negative selection for body weight, Line **s** had a greater number of ovarian follicles in pre-pubertal females than Line **h** and more large (without statistic significance), and similar body weight. At post-puberty, both lines had similar number and diameter of ovarian follicles and number of CL, but Line **h** had greater litter size and coefficient of fertility with similar body weight.

The only significant regression was that of CL on W ($b=0.86$, $R^2=0.87$; $P<0.05$; Fig. 1). Consequently, the number of CL per gram of body weight for each female was estimated; however, there were no differences among lines ($P>0.05$).

Discussion

The two-way selection for body weight modified ovarian follicular development and ovulation in these mice lines. The control Line **t** had, generally, medium values for weight and for the variables related with the ovarian structure and the ovulation rate.

Size distribution of ovarian follicles (small, medium and large) and its variation over time are potential indicators of fertility in the female. In the present study, in the four selected lines, the greatest difference between pre-pubertal and pubertal females was in the ratio of medium and large follicles. The percentage of medium

(and large) follicles in pre-pubertal females increased as they reached puberty; that the percentage of a group of follicles increased was attributed to more follicles entering this category compared to those leaving (Faddy et al., 1976). Furthermore, increased numbers of medium follicles was indicative of increased follicular development, enabling more follicles to be ovulated. Line *s'* differed from the other lines; that the ovarian follicle size distribution was similar for both pre-pubertal and pubertal females in this line was consistent with an earlier onset of puberty, previously detected as vaginal opening occurring earlier in Line *s'* compared to Lines *s* and *t* (Bernardi et al., 1999). Blood gonadotrophin concentrations increased close to the onset of puberty, promoting ovarian follicular development, and ultimately culminating in ovulation (Greenwald and Roy, 1994).

Selection for body weight resulted in concurrent changes in ovulatory capacity, measured as the number of CL; these changes were in the same direction as body weight. Also, Land (1969) estimated a positive genetic correlation (approximately 0.4) between body weight and ovulation rate. Nevertheless, number of CL per unit of body weight was unaffected, consistent with a previous report (Fowler and Edwards, 1960). In that study, the number of ovulated ova was positively correlated with body weight within each line, but the number of ova in relation to body weight was similar among lines.

Positive selection lines differed reproductively, i.e., the selection process did not produce the same correlated responses (Falconer, 1996) in both populations selected for increased weight (*s'* and *h'*), nor for negatively selected lines (*s* and

h). Line *s'* had a higher proportion of large follicles in prepubertal females, a greater capacity to convert these follicles into CL, but a lower capacity to maintain embryos until term than Line *h'*. For negative lines, Line *h* apparently had a reduced incidence of embryonic loss when it was compared with Line *s*. Collectively this could have caused *h* and *h'* to be more reproductively efficient than *s* and *s'*. These differences could have occurred due to the different inbreeding process used in first generations in both line pairs and to differences in the genetic backgrounds of the founder animals from which these lines were derived. The last in accordance with the founder principle proposed by Mayr in 1963, "the establishment of a new population by a few original founders which carry only a small fraction of the total genetic variation of the parental population" (Dobzhansky, 1970).

In conclusion, the ovarian structure, the fertility performance and the reproductive efficiency were modified by the long-term selection for body weight. These modifications were different between both lines of upward selection, the same was observed for negative ones, i. e., it could not be predicted the changes on reproductive traits by effect of body weight selection.

References

Bernardi, S., G. Brogliatti and M. I. Oyarzabal, 1999: Diferencias de fertilidad en ratones seleccionados por peso. *Analecta Veterinaria* 19, 11-17.

- Bünger, L., U. Renne and G. Dietl. 1992: Selection for body weight at 42 days in laboratory mice with and without litter size standardization. Direct response and correlated effects on litter size. *Arch Tierz Dummerstorf* 35, 305-319.
- Dobzhansky, T. 1970: *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press. New York and London.
- Domenichini, M., L. Picardi and S. L. Rabasa. 1989: Depresión de la aptitud por selección en ratones con endocría. *Mendeliana* 9, 57-66.
- Faddy, M. J., E. C. Jones and R. G. Edwards. 1976: An analytical model for ovarian follicle dynamics. *J Exp Zool* 197, 173-186.
- Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 1996: *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman. Fourth Edition.
- Feldman, E. C. and R. W. Nelson. 1991: *Endocrinología y reproducción canina y felina*. Intermédica.
- Fowler, R. E. and R. G. Edwards. 1960: The fertility of mice selected for large or small body size. *Genet Res Camb* 1, 393-407.
- Greenwald, G. S. and S. K. Roy. 1994: Follicular development and its control. *The Physiology of Reproduction*. Edited by E. Knobil and J. D. Neill, Raven Press, Ltd. Second Edition, New York.
- Land, R. B. 1969: Genetic and phenotypic relationships between ovulation rate and body weight in the mouse. *Genet Res* 15, 171-182.
- Luna, L. G. 1987: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Third Edition. McGraw-Hill Book Company.

- Oyarzabal, M. I. and S. L. Rabasa. 1995: Selección divergente de peso en ratones con alta endocría seguida de 90 generaciones de cría libre. *Mendeliana* 10, 119-132.
- Oyarzabal, M. I. and S. L. Rabasa. 1999: Riqueza genética y estabilidad en ratones de la cepa CF1. *Mendeliana* 13, 74-84.
- Rabasa, S. L. and M. T. Font. 1963: Cría y selección de la rata blanca. *Ciencia e Investigación* 19, 133-137.
- Rauw, W. M., E. Kanis, E. N. Noordhuizen-Stassen and F. J. Grommers. 1998: Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Liv Prod Sci* 56, 15-33.
- Roberts, R. C. 1961. The lifetime growth and reproduction of selected strains of mice. *Heredity* 16, 369-381.

Table 1. Percentages of small, medium and large ovarian follicles (corresponding to diameters of 40 to 180, 181 to 280, or >280 μm) per degree of sexual maturity in five lines of mice (selected for body weight).

Line	<i>t</i>		<i>s'</i>		<i>h'</i>		<i>s</i>		<i>h</i>	
	pp	ptp	pp	ptp	pp	ptp	pp	ptp	pp	ptp
Large	3	19	17	21	3	17	5	14	3	18
Medium	15	22	24	23	17	22	12	26	13	20
Small	82	59	59	56	80	61	83	60	84	62

pp: pre-pubertal females; ptp: post-pubertal females

Table 2. Mean (\pm SEM) of the arc sine of the proportion of ovarian follicles per categories, total number of ovarian follicles and follicle diameter in five lines of prepubertal mice (selected for body weight).

Line	n	Small	Medium	Large	No. follicles	Follicle diameter (μm)
t	10	0.96 ± 0.03^a	0.15 ± 0.03^{ab}	0.03 ± 0.01^b	44.7 ± 3.08^b	118.8 ± 3.93^b
s'	11	0.63 ± 0.03^b	0.25 ± 0.03^a	0.17 ± 0.03^a	59.3 ± 5.05^a	172.9 ± 4.24^a
h'	10	0.94 ± 0.06^a	0.18 ± 0.03^{ab}	0.03 ± 0.01^b	39.3 ± 2.15^b	120.0 ± 4.85^b
s	8	0.99 ± 0.07^a	0.12 ± 0.02^b	0.05 ± 0.21^b	45.4 ± 3.20^{ab}	123.6 ± 8.12^b
h	10	1.02 ± 0.07^a	0.13 ± 0.03^b	0.03 ± 0.01^b	23.4 ± 2.34^c	114.9 ± 6.41^b

^{a-c}Within a column, lines without a common superscript differ ($P < 0.05$)

Table 3. Mean (\pm SEM) of the arc sine of the number of ovarian follicles per categories, total number of ovarian follicles and follicle diameter in five lines of pubertal mice (selected for body weight).

Line	n	Small	Medium	Large	No. follicles	Follicle diameter (μm)
t	13	0.63 ± 0.04^a	0.22 ± 0.02^{ab}	0.20 ± 0.02^a	25.9 ± 2.41^{ab}	176.1 ± 6.45^a
s'	13	0.59 ± 0.03^a	0.23 ± 0.01^{ab}	0.21 ± 0.02^a	32.7 ± 2.49^a	178.2 ± 5.12^a
h'	12	0.67 ± 0.03^a	0.21 ± 0.02^{ab}	0.17 ± 0.02^a	23.1 ± 2.23^b	161.7 ± 4.91^a
s	11	0.65 ± 0.02^a	0.26 ± 0.02^a	0.14 ± 0.02^a	19.3 ± 0.5^b	169.3 ± 2.50^a
h	11	0.67 ± 0.03^a	0.20 ± 0.01^b	0.19 ± 0.01^a	20.2 ± 0.6^b	171.2 ± 4.62^a

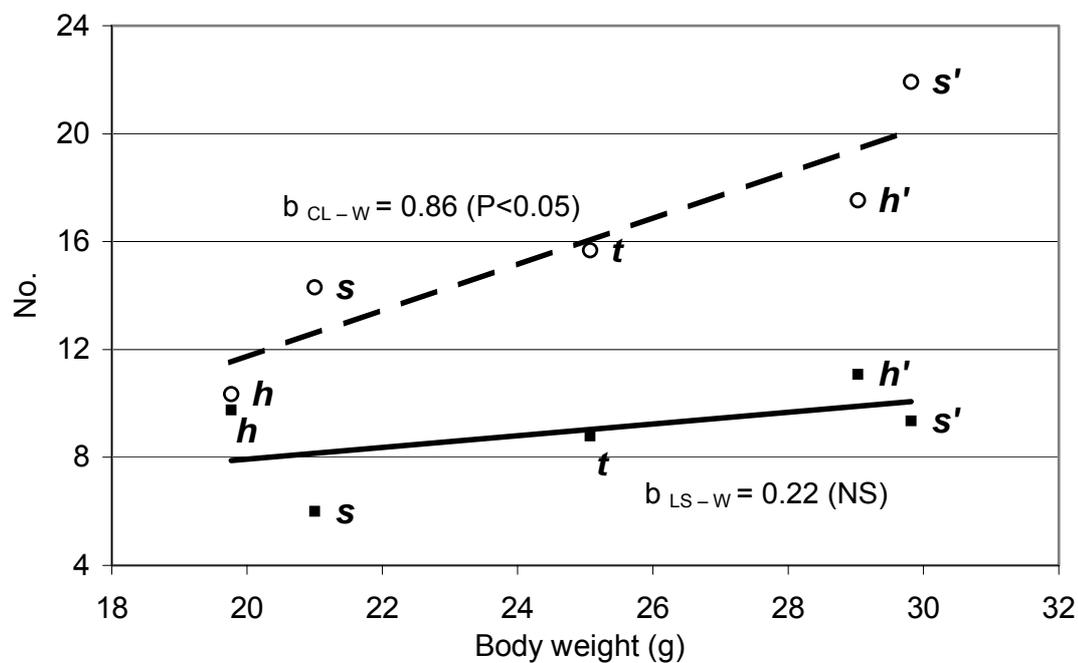
^{a-b}Within a column, lines without a common superscript differ ($P < 0.05$)

Table 4. Mean (\pm SEM) number of corpora lutea (CL), litter size, coefficient of fertility, and body weight in five lines of mice (selected for body weight).

Line	n	No. CL	Litter size	Coefficient of fertility	of Body weight (g)
t	16	15.7 \pm 0.9 ^b	8.8 \pm 0.6 ^a	1.2 \pm 0.1 ^b	25.1 \pm 0.8 ^b
s'	12	21.9 \pm 1.7 ^a	9.4 \pm 0.8 ^a	1.3 \pm 0.1 ^{ab}	32.4 \pm 0.7 ^a
h'	11	17.5 \pm 1.3 ^{ab}	11.1 \pm 0.9 ^a	1.5 \pm 0.1 ^a	31.0 \pm 1.1 ^a
s	13	14.3 \pm 1.5 ^{bc}	6.0 \pm 0.7 ^b	0.7 \pm 0.1 ^c	22.4 \pm 0.5 ^{bc}
h	12	10.3 \pm 0.8 ^c	9.8 \pm 0.5 ^a	1.6 \pm 0.1 ^a	18.9 \pm 1.2 ^c

^{a-c}Within a column, lines without a common superscript differ (P<0.001)

Fig. 1. Regression of number of CL per female (dashed line) and litter size (solid line) on body weight of 5 lines of female mice (selected for body weight).



7.2. Anexo II

Condiciones del *setup* Mouse 2 utilizado para la determinación de los parámetros CASA

Captura de imágenes

- Cuadros por segundo: número de imágenes promedio capturadas por segundo a 60 Hz (Hertz) 60
- Número de cuadros: número total de imágenes secuenciales capturadas para el análisis. Puede ser entre 5 y 100. 30

Detección celular

- Contraste mínimo: intensidad del brillo medida en unidades de píxeles. Es el mínimo brillo aceptable para que el objeto pueda ser capturado. La escala va de 0 a 255. 80
- Tamaño mínimo: se refiere al número mínimo de píxeles que un objeto debe tener para ser considerado por el analizador. 4

Progresividad celular

- VAP: representa el mínimo valor que una célula debe poseer para ser considerada progresivamente mótil. Es la velocidad promedio del recorrido real expresado en micrones/segundo. 25
- STR: mide la desviación de la velocidad promedio a la velocidad en línea recta y se expresa en porcentaje. Es el valor mínimo de STR para que una célula sea considerada mótil y progresiva. 50

Defaults

- Tamaño celular por omisión: representa el valor por omisión del tamaño celular (en pixeles) usado para identificar células estáticas si en el análisis de un cuadro existieran menos de 5 células móviles. 13
- Intensidad mínima considerada. 0.10
- Intensidad máxima considerada. 1.52
- Intensidad celular por omisión: representa el valor por omisión de la intensidad celular (rango de 1-246) usado para identificar células estáticas si en el análisis de un cuadro existieran menos de 5 células móviles. 75
- Elongación mínima entrada. 5
- Elongación máxima considerada. 100

La elongación es la relación del ancho y largo de la cabeza del espermatozoide.