

MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE GATAS TRATADAS CON HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

In Vitro Maturation of Cat Oocytes Obtained From Females Treated with Follicle Stimulating Hormone

Alfonso Sánchez Riquelme¹, Leonardo López Zamorano², Mauricio Silva Jiménez² y Marco Berland Olea²

¹Escuela de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Viña del Mar. Av. Agua Santa # 7255, Rodelillo, Viña del Mar, Chile.

²Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco. Av. Manuel Montt # 56, Temuco, Chile.

E-mail: asanchez@uvm.cl

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento con hormona folículo estimulante (FSH) sobre la calidad y potencial de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de gata. Veintiún gatas adultas fueron asignadas aleatoriamente a grupos de estudio. Grupo FSH (n = 9) 5 mg NIH/día de Foltropin-V por 4 días vía subcutánea y Grupo Control (n = 12) 1 mL de suero fisiológico por 4 días vía subcutánea. Los ovarios fueron obtenidos quirúrgicamente y transportados al laboratorio dentro de las 4 horas subsiguientes a 37°C. Los complejos cumulus-ovocito (CCOs) fueron obtenidos por rebanado ovárico, seleccionándose por criterios morfológicos aquellos considerados aptos para MIV. Se utilizó como medio de maduración TCM-199, BSA (0,4%), FSH (1µL/mL), LH (1µL/mL), 17β estradiol (1µg/mL), gentamicina (50 µg/mL) y piruvato (0,2 mM). El cultivo se realizó durante 24 horas a 38,5°C con 5% de CO₂. Posteriormente los ovocitos fueron denudados, fijados y teñidos para evaluar la maduración, considerándose maduros aquellos para evaluar la maduración, considerándose maduros aquellos para evaluar la maduración, considerándose maduros aquellos para evaluar la maduración, considerándose maduros aquellos para evaluar la maduración. Se recuperaron en promedio por hembra 10,6 ± 3,6 y 7,1 ± 2,8 CCOs aptos para MIV en los grupos FSH y Control respectivamente (P ≤ 0,05). Se recuperó un 25,6% de CCOs aptos para MIV en el grupo FSH y 17% en el grupo Control (P ≤ 0,05). La tasa de MIV para el grupo FSH fue de un 73,6% versus 49,4% en el grupo Control (P ≤ 0,05). Se concluye que el tratamiento con FSH aumenta el número de CCOs aptos para MIV y que estos presentarían un mayor potencial de maduración.

Palabras clave: Ovocito, maduración *in vitro*, gata, gonadotropina, FSH.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effect of Follicle Stimulating Hormone (FSH) treatment on quality and *in vitro* maturation potential of cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from domestic cats. Twenty-one mature cats were randomly assigned to two groups, FSH (n=9) and Control (n=12). Cats in FSH group were treated with 5 mg of Folltropin-V subcutaneously every 24 hours, for 4 consecutive days. Cats in Control group received 1 mL of sterile saline solution every 24 hours for 4 days. Ovaries were obtained surgically 24 hours after the end of the gonadotrophic treatment. Ovaries were then transported to the laboratory at 37°C within 4 hours after surgery. COCs were recovered by slicing, and classified according to morphological features. Maturation medium was based on TCM-199, and supplemented with 0.4% BSA, 1µL/mL FSH, 1µL/mL LH y 1µg/mL of 17β oestradiol, 50 µg/mL gentamicin, 0.20 mM sodium pyruvate. The maturation period was of 24 hours under 38.5°C, 5% CO₂ and saturated humidity. After this period oocytes were denuded, fixed and stained to assess their maturational status. Oocytes were considered mature when it was observed the presence of metaphase II plate and the expulsion of the first polar body. An average of 10.6 ± 3.6 and 7.1 ± 2.8 excellent and good quality COCs were recovered from cats in FSH and Control group respectively (P ≤ 0.05). Twenty five point six percent (25.6%) and 17% of recovered COCs from FSH and Control group respectively were classified as excellent or good (P ≤ 0.05). *In vitro* maturation rate was of 73.6% and 49.4% for the FSH group and the control group respectively (P ≤ 0.05). It can be concluded that FSH treatment increases the number of excellent and good quality oocytes obtained from cats and that these oocytes present a higher *in vitro* maturation potencial.

Key words: Oocyte, *in vitro* maturation, cats, gonadotrophin, FSH.

INTRODUCCIÓN

Los estudios relacionados con las biotecnologías reproductivas en carnívoros domésticos aún son limitados al compararlos con los de otras especies domésticas. Sin embargo en años recientes se ha podido observar un incremento de la investigación en esta área. Al respecto es importante considerar que además de mascotas, los felinos domésticos también sirven de modelo comparativo para el estudio de felinos silvestres [2]. En estas últimas especies las biotecnologías reproductivas como inseminación artificial, fecundación y producción de embriones *in vitro* y transferencia de embriones, así como la criopreservación de gametos y embriones, resultan fundamentales, tanto para cooperar en la preservación de la biodiversidad, así como también para el desarrollo de investigación básica [10].

En felinos, al igual que en el resto de las especies domésticas, la maduración de ovocitos *in vitro* (MIV) ha constituido un paso fundamental para el avance de biotecnologías tales como la fecundación y producción de embriones *in vitro* [3], inyección intracitoplasmática de espermatozoides [1] y transferencia nuclear [6]. No obstante los promisorios avances alcanzados en la MIV de ovocitos de gata, los resultados descritos en general son inferiores a los obtenidos en MIV de ovocitos de especies de granja [2], constituyendo un desafío el poder mejorar las condiciones que permitan elevar las tasas de MIV.

Dado que en la mayoría de los estudios sobre FIV en gatas, los ovocitos han sido obtenidos de ovarios no estimulados hormonalmente o bien madurados *in vivo*, existe escasa información sobre los resultados de MIV en ovocitos provenientes de hembras previamente tratadas con gonadotrofinas. Se ha demostrado que la estimulación ovárica de gatas mediante la administración de hormona folículo estimulante (FSH) produce un aumento del número de folículos de tamaño preovulatorio (≥ 2 mm) [11, 14]; y consecuentemente del número de complejos cumulus-ovocito (CCOs) de buena calidad (categorías I y II) potencialmente aptos para MIV [14]; esto resulta particularmente importante al considerar que en gatas no estimuladas con gonadotrofinas menos del 15% de todos los ovocitos intraováricos recuperados pueden ser clasificados como excelentes (categoría I); lo que se debería a que estos al momento de ser recuperados pueden presentar diferentes grados de alteraciones relacionadas con la atresia folicular. Por ello, además, variaría su funcionalidad *in vitro*, esto en términos de la habilidad para alcanzar la madurez nuclear, ser fecundados y desarrollarse posteriormente [19].

El presente trabajo propone que ovocitos obtenidos de gatas tratadas con hormona folículo estimulante presentarían un mayor potencial de maduración *in vitro* respecto de hembras no estimuladas. Planteándose como objetivos evaluar la tasa de recuperación y calidad de los CCOs en gatas estimuladas con FSH; así como la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de gatas estimuladas con FSH respecto de animales sin estimulación gonadotrófica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del estudio se emplearon 21 gatas domésticas adultas no gestantes y sin información de la fase del ciclo, con pesos que fluctuaron entre 2 y 3,5 kg, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

- Grupo FSH (n = 9), administración cada 24 horas de 5 mg NIH de FSH (Folltropin-V, Vetrepfarm; Canadá), vía subcutánea por 4 días consecutivos.
- Grupo Control (n = 12), administración cada 24 horas de 1 mL de suero fisiológico (NaCl 0,9%), vía subcutánea por 4 días consecutivos.

Veinticuatro horas después del término del tratamiento se realizó la ovario-histerectomía (OH). Las gatas fueron anestesiadas utilizando una asociación de ketamina 20 mg/kg (Ketostop®, Drag-Pharma; Chile) y xilacina 2 mg/kg (Ronpum® Bayer; Alemania). Inmediatamente después de la cirugía los ovarios fueron recuperados y depositados en tubos con solución fisiológica y antibióticos (penicilina sódica: 0,08 g/L y estreptomina: 0,1 g/L) a aproximadamente 37°C, y dentro de 4 horas post-cirugía fueron transportados al laboratorio. Con el propósito de liberar los CCOs los ovarios fueron lavados y posteriormente rebanados mediante finos cortes con bisturí (*slicing*) en una placa con PBS conteniendo 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA). El medio decantado, proveniente del rebanamiento de los ovarios, fue observado bajo lupa estereoscópica para la recuperación y evaluación de los CCOs. El criterio de clasificación de los CCOs se fundamentó en aspectos morfológicos de las células del *cumulus oophorus* y la corona radiada, así como en la homogeneidad del citoplasma del ovocito según criterios previamente definidos para esta especie [19]. En resumen:

- Categoría I: citoplasma oscuro uniforme, núcleo redondo, con 5 o más capas compactas de células de la granulosa;
- Categoría II: citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero rodeado por menos de 5 capas de células de la granulosa;
- Categoría III: pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas de células de la granulosa son menos compactas;
- Categoría IV: citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y de la granulosa se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

De acuerdo a esta clasificación los ovocitos han sido clasificados como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV. En base a este criterio se seleccionaron los CCOs aptos para MIV, siendo transferidos a una placa de cultivo conteniendo el siguiente medio de maduración: TCM 199; 0,4% BSA; gentamicina 50 µg/mL; piruvato 0,2 mM; 17-βestradiol 1 µg/mL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO,

EUA); LH 1 µL/mL (Lutropin-V, BIONICHE, Canadá); FSH 1 µL/mL (Folltropin-V, Bioniche, Canadá) (TABLA I).

Posteriormente los ovocitos seleccionados, de ambos grupos de tratamiento, fueron depositados en grupos de aproximadamente 5 en gotas de maduración de 25 µL cubiertas con aceite mineral y cultivados por un período de 24 horas a 38,5°C en ambiente saturado de humedad con 5% de CO₂. Completado el período de maduración, los ovocitos fueron extraídos de las gotas de cultivo para la remoción mecánica de las células del *cumulus oophorus* y fijación por 24 h en ácido acético-etanol (1:3), luego fueron teñidos con aceto-orceína (1% de orceína en ácido acético 45%) por 30 minutos y a continuación se procedió a aclarar los ovocitos mediante solución decolorante. Los ovocitos teñidos fueron examinados bajo microscopio de contraste de fase y el criterio para evaluar la maduración ovocitaria fue la presencia de la placa II metafásica y el primer corpúsculo polar. Los ovocitos que no presentaron las características anteriores se consideraron como inmaduros y aquellos ovocitos fragmentados o de forma irregular se consideraron como degenerados.

Para el análisis estadístico de los datos de recuperación y clasificación de CCOs así como de la tasa de MIV se empleó la prueba de Ji-cuadrado considerando como significativo un valor de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuperación de complejos cúmulo-ovocito (CCOs)

Un total de 874 CCOs fueron obtenidos a partir de 44 ovarios, de estos 181 fueron clasificados como aptos para MIV (20,7%). No se observó diferencias en el promedio de CCOs totales recuperados por gata en los grupos FSH y Control, alcanzándose valores de $41,6 \pm 6,2$ y $41,6 \pm 9,9$ respectivamente. Cabe destacar que en felinos, al igual que en otras especies [4, 9], la calidad de los CCOs tiene una implicación directa sobre el potencial de maduración de los ovocitos, siendo por tanto sugerido el clasificar y seleccionar los CCOs destinados a MIV, utilizando preferentemente aquellos que presentan el ovoplasma homogéneo y varias capas compactas de células

TABLA I
MEDIO DE MADURACIÓN / MATURATION MEDIUM

| Componente | Concentración |
|----------------|---------------|
| TCM 199 | - |
| BSA | 0, 4% |
| FSH | 1µL/mL |
| LH | 1µL/mL |
| Gentamicina | 50 µg/mL |
| Piruvato | 0,2 mM |
| 17-β Estradiol | 1µg/mL |

de la granulosa [8, 13, 19]. En relación con la recuperación de CCOs aptos para MIV se obtuvo un promedio por gata de $10,6 \pm 3,6$ y $7,1 \pm 2,8$ en los grupos FSH y control respectivamente, denotando un efecto positivo de la estimulación gonadotrófica ($P < 0,05$).

Además de incrementar la tasa de recuperación de CCOs aptos para MIV, el tratamiento con FSH permitió obtener un aumento significativo en la cantidad de CCOs de la categoría I respecto del grupo Control ($P \leq 0,05$) (TABLA II). Ambos efectos podrían ser atribuidos a un mayor desarrollo de folículos preovulatorios en los ovarios de las gatas tratadas, estructuras en las que se ha descrito mayor presencia de CCOs aptos para MIV y particularmente mayores proporciones de CCOs de categoría I respecto de folículos $< 2,0$ mm [14, 19]. Estos resultados adquieren particular relevancia si se considera que ovocitos de categoría I presentarían una alta probabilidad de desarrollo posterior a la MIV/FIV y alcanzar estados de mórula y blastocisto en proporciones similares a las observadas en oviducto y cuernos uterinos de gatas 5 a 6 días después de la monta natural [16].

El promedio de CCOs aptos para MIV recuperados a partir de ovarios de gatas tratadas con FSH, resultó levemente superior al descrito en un trabajo anterior ($9,0 \pm 3,0$) donde se utilizó el mismo protocolo para la estimulación ovárica [14], esta diferencia podría ser atribuida al método de colección de los CCOs, ya que en dicho estudio los ovocitos fueron obteni-

TABLA II
RECUPERACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE COMPLEJOS CUMULUS-OVOCITO APTOS PARA MADURACIÓN *IN VITRO* OBTENIDOS DE GATAS TRATADAS CON HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) / RECOVERY RATE AND NUMBER OF EXCELLENT AND GOOD QUALITY OOCYTES CUMULUS COMPLEXES RECOVERED FROM CATS TREATED WITH FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH)

| Grupo | CCOs recuperados | CCOs aptos para MIV | | |
|-------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Total | Categoría I | Categoría II |
| FSH (n=9) | 375 | 25,6% ^a (96/375) | 30,2% ^a (29/96) | 69,8% ^a (67/96) |
| Control (n=12) | 499 | 17,0% ^b (85/499) | 17,6% ^b (15/85) | 82,4% ^b (70/85) |

a, b: letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$).

TABLA III
TASA DE MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS OBTENIDOS DE GATAS TRATADAS CON HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE / FSH *IN VITRO* MATURATION RATE OF OOCYTES OBTAINED FROM CATS TREATED WITH FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH)

| Grupo | Ovocitos cultivados (n) | Ovocitos perdidos en la tinción (%) | Ovocitos maduros (%) | Ovocitos inmaduros y degenerados (%) |
|---------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| FSH | 96 | 5,2% (5/96) | 73,6% ^a (67/91) | 26,4% ^a (24/91) |
| Control | 85 | 4,7% (4/85) | 49,4% ^b (40/81) | 50,6% ^b (41/81) |

a, b: letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$).

dos por aspiración folicular, método reconocidamente menos eficiente que el rebanamiento ovárico (*slicing*) usado en el presente trabajo.

Maduración *in vitro* de ovocitos

De un total de 181 ovocitos seleccionados para MIV un 5,0% se perdió durante los procedimientos de lavado, eliminación de células del cumulus y fijación. La tasa de maduración total fue de 62,2% (107/172), valor similar al descrito en varios estudios en felinos domésticos [5, 19, 20].

En el grupo de gatas estimuladas con FSH se evaluaron un total de 91 ovocitos de los cuales el 73,6% alcanzaron el estado de metafase II. Este valor resultó significativamente superior ($P \leq 0,05$) al obtenido en el grupo Control donde, de 81 ovocitos evaluados sólo el 49,4% alcanzó igual estado. En la TABLA III se pueden observar las tasas de MIV de ovocitos provenientes de gatas tratadas con FSH y grupo Control.

Estos resultados sugieren que el estímulo gonadotrófico con FSH permitiría obtener ovocitos con una mayor capacidad de reiniciar la meiosis, lo cual incidiría en las mejores tasas de MIV en comparación al grupo Control del presente estudio. Dado que no se ha descrito un efecto directo de la FSH sobre la competencia meiótica de los ovocitos felinos, es posible postular que al igual que en otras especies [7, 15, 17, 18], en la gata doméstica existiría una relación positiva entre el mayor tamaño folicular alcanzado en hembras tratadas con FSH y la competencia meiótica de los ovocitos.

Si bien se han descrito mayores tasas de MIV en ovocitos provenientes de CCOs categoría I respecto de CCOs categoría II, argumentándose que los ovocitos derivados de CCOs categoría I tendrían una mayor capacidad de reiniciar la meiosis [19], en el presente estudio no se observaron diferencias estadísticas en las tasa de MIV al comparar ambas categorías de CCOs, tanto en el grupo tratado con FSH como en el grupo Control. Sin embargo, se podría postular una posible relación entre tratamiento con FSH y categoría de los CCOs al encontrarse que la mayor tasa de MIV fue registrada en ovocitos de CCOs categoría I en gatas tratadas con FSH (85,7%) y la menor en ovocitos de CCOs categoría II en gatas del grupo Control (48,5%).

Cabe destacar que la tasa de MIV superior al 70% obtenida en ovocitos provenientes de gatas tratadas con FSH resulta alentadora si se considera que el medio de maduración empleado es simple o de baja complejidad respecto de los usados en estudios con tasas de MIV similares, donde se describe la suplementación del medio de cultivo con BSA [12], BSA + cistamina [1] o suero fetal bovino + factor de crecimiento IGF-I [6].

CONCLUSIONES

En gatas domésticas, la administración de 5 mg NIH/día de FSH, vía subcutánea, durante 4 días, permite aumentar significativamente el número de CCOs aptos para maduración *in vitro*, donde además los ovocitos obtenidos muestran un mayor potencial de maduración *in vitro* respecto de animales sin tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; ZEDDA, M.; CARLUCCIO, A.; PAU, S. Intracytoplasmatic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cat with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Theriogenol.** 56: 955 - 967. 2001.
- [2] FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim. Reprod. Sci.** 60-61: 375-387. 2000.
- [3] GOMEZ, M.; POPE, E.; HARRIS, R.; MIKOTA, S.; DRESSER, B. Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. **Theriogenol.** 60: 239-251. 2003.
- [4] GOODHAND, K.; WATT, R.; SATINES, M.; HUTCHINSON, J.; BROADBENT, P. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenol.** 51: 951-961. 1999.

- [5] KARJA, N.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. **Theriogenol.** 57: 2289-2298. 2002.
- [6] KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. **Theriogenol.** 59: 1775-1786. 2003.
- [7] LEFEVRE, B.; GOUGEON, A.; NOME, F.; TESTART, J. In vivo changes in oocyte germinal vesicles related to follicular quality and size at mid-follicular phase during stimulated cycles in the cynomolgus monkey. **Reprod. Nutr. Develop.** 29: 523-532. 1989.
- [8] LENGWINAT, T.; PITRA, C.; BLOTTNER, S. Developmental competence of domestic cat follicular oocyte after fertilization in vitro with epididymal sperm and co-culture of feline oviductal epithelial cells. **Reprod. Dom. Anim.** 27:236-243. 1992.
- [9] LONERGAN, P. Factors affecting oocyte quality and its assessment. **Reprod. Dom. Anim.** 35(Supp. 6): 33-37. 2000.
- [10] LUVONI, G. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. **Reprod. Nutr. Dev.** 40: 505-512. 2000.
- [11] OROSZ, S.; MORRIS, P.; DOODY, M.; NIEMAYER, G.; CORTELYOU L, J.; EATON, N.; LOTHROP, C. Stimulation of folliculogenesis in domestics cats with human FSH and LH. **Theriogenol.** 37: 993-1004. 1992.
- [12] OTOI, T.; MURAKAMI, M.; OOKA, A.; KARJA, N.; SUZUKI, T. Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. **Vet. Rec.** 148: 116-118. 2001.
- [13] POPE, C.; MC RAE, M.; PLAIR, B.; KELLER, G.; DRESSER, D. *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes. **J. Reprod. Fert.** (Supp. 51): 69-82. 1997.
- [14] SÁNCHEZ, A.; SILVA, M. Evaluación de la respuesta ovárica y calidad ovocitaria en gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH) y utilizando dos esquemas de administración. **Arch. Med. Vet.** 35 (1):119-126. 2003.
- [15] SCHRAMM, R.; TENNIER, M.; BOATMAN, D.; BAVIS-TER, B. Chromatin configuration and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in non-stimulated rhesus monkeys. **Biol. Reprod.** 48: 349-356. 1993.
- [16] SWANSON, W.; ROTH, T.; WILDT, D. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. **Biol. Reprod.** 51: 452-464. 1994.
- [17] TSAFIRI, A.; CHANNING, C. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pigs oocytes *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 43: 149-152. 1975.
- [18] TSUJI, A.; SOWA, M.; NAKANO, M. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. **Biol. Reprod.** 32: 413-417. 1985.
- [19] WOOD, T.; WILDT, D. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and development into blastocysts *in vitro*. **J. Reprod. Fert.** 110: 355-360. 1997.
- [20] WOOD, T.; BYRES, A.; JENNETTE, J.; WILDT, D. Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilization cat eggs. **J. Reprod. Fert.** 104: 315-323. 1995.