EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FSHo Y DE LA ESTACIÓN SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA FOLICULOCENTESIS OVÁRICA EN CABRAS.

J.L. Alabart, A. Roche, J.I. Martí, B. Aguilar, E. Echegoyen, J. Folch.

Unidad de Tecn. en Prod. Animal. CITA de Aragón. Apdo 727, 50080 Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

La obtención de oocitos inmaduros mediante aspiración de folículos ováricos en el animal vivo (ovum pick-up, OPU) es una técnica en auge por ser el punto de partida de diversas Biotecnologías de la reproducción: producción *in vitro* de embriones (PIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), clonación, criopreservación de oocitos, etc. En los esquemas de selección de pequeños rumiantes se podrían producir más descendientes por hembra mediante OPU y PIV que con el método de superovulación y transferencia de embriones (MOET) debido a que pueden realizarse más intervenciones durante la vida del animal y con un intervalo menor entre ellas. Frente a la utilización de ovarios procedentes de matadero, una de las ventajas es que permite obtener oocitos de animales con un historial genético y sanitario conocido. Además, en caprino, la obtención de oocitos de ovarios de matadero es difícil en España, ya que se sacrifican pocas hembras y menos en estado adulto, y el rendimiento de PIV a partir de oocitos de chotas prepúberes es bastante bajo (Izquierdo *et al.,* 2002).

En este trabajo se pretende estudiar el efecto del tratamiento con hormona folículo-estimulante de origen ovino (FSHo) sobre los rendimientos de 4 sesiones de OPU a intervalos semanales tanto en época de estro como en anestro estacional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 25 cabras mestizas, 13 cíclicas en época de estro (6 tratadas con FSH (FSH) y 7 controles (C)) y 12 no cíclicas en época de anestro (7 FSH y 5 C). Se consideraron cíclicas aquéllas con niveles de progesterona plasmática de al menos 1ng/ml en al menos una de 2 tomas separadas 7 días. La progesterona se midió mediante kits comerciales (Coat-A Count®, DPC, USA).

Las cabras se sincronizaron con esponjas vaginales (45mg FGA; Chronogest®, Intervet) durante 12 días y 125µg i.m. de Cloprostenol (Estrumate™, Schering-Plough Animal Health, Germany) 48h antes de su retirada. La 1ª sesión de OPU se realizó el día de la retirada de la esponja y las 3 siguientes a intervalos de 7 días. Las cabras tratadas con FSH recibieron un total de 4.4 mg de NIADDK-oFSH-17 (Ovagen™, ICPbio (UK) Ltd.) distribuidos en 2, 2 y 1ml i.m. 48, 36 y 24h antes de cada sesión, respectivamente.

La OPU se realizó por laparoscopia bajo anestesia general (500mg/20ml i.v. de Tiopental sódico / Halotano-O_2 por vía inhalatoria). Se practicaron 3 orificios en la parte más caudal del abdomen, uno sobre el lado izquierdo y dos sobre el derecho, separados 3cm de la línea alba, para introducir el endoscopio, el catéter-guía para la aguja, y una pinza de agarre atraumático para inmovilizar el ovario, respectivamente. El endoscopio se acopló a una cámara de vídeo en color, conectada a un monitor y grabador de vídeo.

Se aspiraron todos los folículos de diámetro igual o mayor a 1.5mm. Dichos folículos se clasificaron en pequeños (1.5-3mm), medianos (4-5mm), de 6-7mm, y mayores de 7mm.

Para la punción folicular se utilizó un Venofix® (Braun, Germany) al que se suprimieron las dos alas de plástico (aguja de 20mm de longitud, 0.65mm (23G) de diámetro externo y 0.45mm de diámetro interno, conectado a un tubo de silicona de 1.5mm de diámetro interno que se acortó a 24cm). Los 14cm próximos a la aguja se introdujeron en un tubo de plástico de 2.6mm de diámetro interno para proporcionarle rigidez. El otro extremo se conectó a un tubo Falcon® (Becton Dickinson, USA) de 15ml a través de un tapón de goma provisto de un segundo agujero de salida conectado a la bomba de aspiración (-25 a -30 mm Hg; 6-7ml/minuto; V-MAR 5100, COOK Ltd., Australia). El tubo de 15ml se mantuvo inmerso en agua destilada a 38ºC dentro de otro Falcon® de 50ml. Antes de la punción folicular, se aspiró 1ml de medio TCM 199 con 0.04 mg/ml gentamicina, 10mM Hepes (SIGMA) y 0.1 mg/ml heparina (ROVI), a 38ºC. Tras realizar la foliculocentesis, se irrigó el ovario con 30ml de suero fisiológico estéril heparinizado (25000 UI/l) a 38ºC a través del catéter-guía para minimizar la aparición de adherencias. Al final de cada sesión de OPU se administró 1ml/10Kg PV de oxitetraciclina XL 300 (Solmycin^{TM}, Fort Dodge, Spain).

Los complejos oocito-cumulus (COC) se recuperaron del medio de colecta y se contaron bajo un estereomicroscopio. La calidad se evaluó atendiendo a la apariencia del cúmulus y homogeneidad del citoplasma (Stangl *et al.,* 1999; Lonergan *et al.,* 1994), clasificándose en 5 clases: I (oocito con el cúmulus completo), II (cúmulus incompleto), III (oocito rodeado por la corona radiata y 2-3 capas de células del cúmulus), IV (oocito desnudo) y V (cúmulus expandido). Las 3 primeras se consideraron aptas para PIV.

Los resultados por cabra y sesión se analizaron mediante ANOVA para medidas repetidas, mediante el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico SAS (SAS, 1999). Los porcentajes se analizaron mediante el procedimiento CATMOD del SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de folículos totales por cabra y sesión fue similar en estro y anestro, así como en los lotes FSH y C (Tabla 1), a diferencia de lo observado por Locatelli *et al*., (2004) en esta misma especie. Dichos autores utilizaron el mismo protocolo pero aspiraban sólo los folículos mayores de 2mm.

La población folicular (distribución por tamaños) también fue similar en ambas estaciones, pero no en ambos lotes; así, el porcentaje de folículos pequeños (1.5-3mm) fue un 20.7% menor en el lote FSH ($P<0.0001$), mientras que los porcentajes de folículos medianos (4-5mm), de 6-7mm y de mayores de 7mm fueron un 11.6%, 7.2% y 1.9% mayores en dicho lote (cada uno, $P<0.0001$). Es decir, el tratamiento con FSH no incrementó el número total de folículos pero sí el tamaño folicular medio. Por ello, a pesar de que en ambos lotes se recuperó un número similar de oocitos totales por cabra y sesión (Tabla 1), su calidad fue mejor en el lote FSH. Así, el lote FSH superó al control en 3.1 oocitos aptos para PIV (Clases I+II+III) por cabra y sesión ($P<0.05$), debido a un incremento en dicho lote de un 14.6% en el porcentaje de oocitos de clase III ($P<0.0001$) en detrimento de los de clase IV (desnudos; disminución de un 27.1%; $P<0.0001$). Esta mejora de la calidad coincide con lo observado por Locatelli *et al*., (2004).

No hubo efectos estadísticamente significativos de la estación sobre el número total de oocitos recuperados por cabra y sesión o sobre el de oocitos aptos para PIV.

En resumen, la aplicación semanal de FSH durante 4 sesiones consecutivas de OPU estimula el desarrollo folicular, aumentando el número de folículos medianos y grandes en detrimento de los pequeños, por lo que los oocitos presentan una mejor calidad morfológica, ya que incrementa el porcentaje de oocitos con tres capas de células del cumulus y reduce el porcentaje de oocitos desnudos.

Tabla 1. Población follicular y calidad oocitaria según lotes de tratamiento y época del año. FAT: Folículos aspirados totales; ORT: oocitos recuperados totales (datos por cabra y sesión; medias ± error estándar de 4 sesiones a intervalos de 7 días).

	FSH (n=13)	Control (n=12)	Estro (n=13)	Anestro(n=12)
FAT	25.7±2.7 [a]	25.6±2.8 [a]	25.5±2.7 [a]	25.9±2.8 [a]
1.5-3 mm (%)	64.2 [a]	84.9 [b]	76.3 [a]	71.8 [a]
4-5 mm (%)	22.7 [a]	11.1 [b]	14.5 [a]	20.0 [a]
6-7 mm (%)	10.2 [a]	3.0 [b]	6.4 [a]	7.2 [a]
> 7mm (%)	2.9 [a]	1.0 [b]	16.5 [a]	10.3 [a]
ORT	11.7±1.3 [a]	10.2±1.4 [a]	10.4±1.3 [a]	11.5±1.4 [a]
Clases (I+II+III)	9.8±1.1 [c]	6.7±1.1 [d]	7.8±1.1 [a]	8.6±1.1 [a]
Clase III (%)	61.4 [a]	46.8 [b]	56.0 [a]	53.9 [a]
Desnudos (%)	10.5 [a]	37.6 [b]	23.1 [a]	18.5 [a]

[a, b]: P< 0.001; [c,d]: P<0.05, entre lotes o entre estaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Izquierdo D, Villamediana P, Lopez-Bejar M, Paramio MT. (2002). Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. Theriogenology 57: 1431-1441

Locatelli Y, Poulin N, Baril G, Touzé JL, Bouttier A, Cognié Y, Mermillod P. (2004). FSH treatment before laparoscopic ovum pick-up in goat influences quantity and quality of recovered oocytes. Reprod Fertil Develop 16 (4): 513

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. Mol Reprod Dev 37 (1): 49-53

SAS (1999). SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Stangl M, Kuhholzer B, Besenfelder U, Brem G. (1999). Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. Theriogenology. 52: 709-716

Trabajo cofinanciado por FEDER-INIA (proyectos RZ00-012-C2 y RZ01-023-C2) y Gobierno de Aragón (beca predoctoral).