UTILIZACIÓN DE LA LOPU EN CAPRINO: VALORES FOLICULARES Y OVOCITARIOS

Romaguera, R., Chacaltana, A., Fonseca, C., Anguita, B., Catalá, M., Casanovas, A., Mogas, T., Izquierdo D., Paramio, MT.
Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona. teresa.paramio@uab.es

INTRODUCCIÓN

Los ovocitos de cabras prepúberes tienen unos porcentajes de maduración nuclear y fecundación total similares a los ovocitos de cabras adultas (Martino *et al.,* 1994) aunque presentan mayores tasas de fecundaciones anormales (Mogas *et al.,* 1997). Diferentes autores indican que los ovocitos de hembras prepúberes muestran un menor desarrollo embrionario que los procedentes de hembras adultas (revisado por Armstrong, 2001).

Tanto en animales adultos como en prepúberes, al aumentar el diámetro folicular incrementa el diámetro ovocitario (Arlotto *et al.,* 1996) y su capacidad de desarrollo embrionario (Kauffold *et al.,* 2005). Este hecho ya ha sido descrito en cabras adultas por Crozet et al., (1995), los cuales observaron que los ovocitos procedentes de folículos de 2 a 3 mm, de 3 a 5 mm y de más de 5 mm, producían un 6, 12 y 26% de blastocistos, respectivamente. Además, en otro estudio publicado por el mismo equipo (Crozet *et al.,* 2000), los ovocitos contenidos en los folículos > 2 mm tenían un diámetro de 136 µm. En cabras prepúberes, Martino *et al.* (1994) observaron que la mayor parte de la población folicular es de diámetro menor a 3 mm y que en el interior de los folículos de 2 a 3 mm los ovocitos tenían un diámetro de 135 µm.

Nuestra hipótesis de trabajo es por lo tanto, comprobar si el menor desarrollo del ovocito de prepúber es por su origen en folículos pequeños o por características intrínsecas en las hembras prepúberes. Para conseguir este objetivo es necesario obtener folículos grandes en hembras prepúberes (estimulación folicular con FSH) y recoger sus ovocitos mediante LOPU. En este primer estudio, se tiene como objetivo poner a punto la LOPU en cabras adultas para disponer de una metodología eficaz que nos permita obtener ovocitos de folículos de diámetro conocido y de hembras de edad y estado fisiológico conocido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 cabras adultas de la raza Murciano Granadina de entre 13 y 24 meses de edad (31,8±1,9 kg PV) pertenecientes a la Granja Experimental de la UAB.

Se realizaron cuatro sesiones de LOPU separadas entre ellas 14 días durante los meses de noviembre a enero. En cada sesión los animales fueron sincronizados mediante la aplicación de una esponja vaginal de acetato de fluorogesterona (30 mg; Chrono-gest®. Intervet, España) durante 10 días combinada con un tratamiento luteolítico de 125 IU de cloprostenol (Estrumate® Schering-Plough S.A, Reino Unido) intramuscular 48 horas antes de la retirada de la esponja y coincidiendo con la LOPU. Para la estimulación ovárica se les administró 125 IU FSHp (PLUSET®, Calier S.A, España) dividida en cuatro dosis decrecientes (39, 39, 23.5, 23.5 im FSH-LH) separadas entre ellas 12 horas e iniciándose 48 horas antes de cada sesión (Baldassarre et al., 1996).

Al inicio de la sesión se les administraba una anestesia general constituida por una premedicación de midazolam (0,01 mg/Kg. Dormicum® 5mg/ml; Roche, España) con buprenorfina (0,2 mg/Kg. Buprex® 0,3mg, Schering-Plough S.A., Reino Unido) intramuscular, una inducción con propofol (4,3 mg/Kg Lipuro1%, B.Braun, Alemania) intravenosa y el mantenimiento con isofluorano (isoflo®, Lab. Dr. Esteve S.A., España) vía inhalatoria.

La técnica LOPU ("laparoscopic ovum pick up") se realizó según el protocolo descrito por Roche (2005) en caprino. Brevemente, se les colocaba en posición supina y con una inclinación de 45º. Se les realizaba tres incisiones, cranealmente a la glándula mamaria, el primero próximo a la línea alba, el segundo al lado izquierdo del animal y el último al lado derecho separados entre ellos 10 cm. En cada una de las incisiones se introdujo, el endoscopio, la pinza de sujeción atraumática y el catéter guía para la entrada de la aguja de aspiración.

El ovario se visualizaba a través de un monitor de televisión conectado al endoscopio mediante la cámara de vídeo. A continuación se sujetaba el ligamento ovárico con la pinza atraumática y se aspiraban los folículos en función de su diámetro, clasificándose como

pequeños (FP) los de 2-3 mm, medianos (FM) los de 3 a 5 mm y grandes (FG) los de más de 5 mm (Crozet *et al.,* 1995).

La fabricación de la aguja de aspiración y el sistema colector es semejanza del protocolo citado. La bomba de aspiración utilizada realizaba un vacío de entre 8 y 10 ml por minuto.

El medio de recolección constaba de PBS (Gibco) suplementado con 1 mg/ml Glucosa (Sigma), 0,036 mg/ml Piruvato sódico (Sigma), 0,5 mg/ml de BSA Fracción V (Sigma), 0,05 mg/ml Gentamicina (Sigma) y 0,1mg/ml heparina (Sigma). Al finalizar la sesión se irrigaba el ovario con suero fisiológico heparinizado (Heparina sódica 5%, ROVI S.A, España), se suturaban los orificios con sutura 2/0 no reabsorbible (Dafilon®, B.Braun, España) y se aplicaba un cicatrizante tópico (Aluspray®, vetoquinol, Francia).

En función del diámetro folicular, los complejos cúmulus ovocitos (COCs) recuperados del medio de colecta se visualizaban a través del estereomicroscopio y se clasificaban según la morfología de su cúmulus en una de las cinco categorías, en función de los criterios de Marquant-Leguienne (1999). Posteriormente, los ovocitos se denudaban de las células del cúmulus con PBSm y se les medía su diámetro a 96 aumentos excluyendo la zona pelúcida.

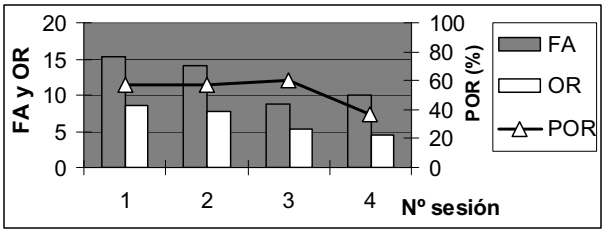
Los porcentajes de ovocitos recuperados (POR) y la categoría de COCs fueron analizados mediante un test de Fisher (Graph-Pad Instat 3.01 del Windows 95) y se utilizó el análisis de la varianza para valorar el diámetro ovocitario (ANOVA) y el efecto de la sesión sobre el rendimiento de la LOPU (Proc MIXED de SAS para medidas repetidas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aspiraron 248 folículos (12,13±3,78 folículos por animal) y se recuperaron 138 ovocitos (6,94±2,85 ovocitos por animal) obteniendo un POR del 57%±18,09. La eficiencia de la recuperación en la bibliografía va desde el 90% (Pierson *et al.,* 2005) hasta el 33 % (Alberio *et al.,* 2002).

En la figura 1 se representa los resultados del efecto del número de sesión sobre el rendimiento de la LOPU por hembra. No se encontraron diferencias significativas en el número medio de folículos aspirados (p< 0,18), ovocitos recuperados (p< 0,22) y porcentaje de de ovocitos recuperados (POR) (p< 0,64) aunque se detecta una disminución de todos los parámetros con el transcurso de las sesiones.

Figura 1 - Efecto de la sesión de LOPU por hembra sobre el número medio de folículos aspirados (FA), ovocitos recuperados (OR) y porcentaje de ovocitos recuperados (POR).



El diámetro folicular no afectó al POR (tabla 1) a diferencia de lo observado por Roche (2005), quien obtuvo un POR significativamente inferior en los folículos más pequeños.

Según la clasificación morfológica realizada, el porcentaje de ovocitos clasificados como aptos para la producción *in vitro* de embriones (grados I y II) fue del 62,32 % (86/138). Además, a medida que incrementa el diámetro folicular se recupera un mayor número de COCs de mejor calidad morfológica (categoría I), tal y como ya había sido descrito por Roche (2005), y un mayor número de COCs con cúmulus expandidos.

Al igual que lo observado por Crozet et al. (2000), los resultados de la tabla 2 indican que, cuando los folículos alcanzan un diámetro de 2 mm, el diámetro del ovocito no varía con el aumento del diámetro del folículo. En ovocitos de cabras prepúberes, Martino *et al.* (1994) ya indicó que en los folículos < 2 mm los ovocitos medían 128 µm, en los de 2 a 3 mm 135 µm y que en los > de 3 mm el diámetro ovocitario ya no aumentaba significativamente (136 µm). Así, observamos que los ovocitos de cabras adultas y

prepúberes alcanzan su máximo tamaño alrededor de los 135 µm, independientemente del diámetro del folículo.

Tabla 1 - Efecto del diámetro de folículo sobre el porcentaje de ovocitos recuperados y las características morfológicas del COCs

DIÁMETRO FOLICULAR		2-3 mm	3-5 mm	> 5mm	TOTAL
POR (%)		50.91[a]	58.46[a]	56.25[a]	55.65[a]
Categoría morfológica COCs* (%)	I	2[bB] (7,14)	5[bB] (13,16)	18[aAB] (25)	25[B] (18,12)
	II	15[bA](53,57)	19[abA] (50)	27[aA] (37,5)	61[A] (44,2)
	III	6[aB] (21,43)	9[aB](23,68)	9[aB] (12,5)	24[B] (17,39)
	IV	2[aB](7,14)	3[aB](7,89)	1[aC] (1,39)	6[C](4,35)
	V	3[bB] (10,71)	2[bB] (5,26)	17[aAB] (23,61)	22[B] (15,94)

* I: complejo cúmulos/corona completos y citoplasma homogéneo; II más de dos capas de células de cúmulos; III: una capa de células o cúmulus incompleto; IV: No cúmulus y/o ovocito degenerado; V: cúmulus expandido. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre filas y las letras mayúsculas diferencias entre columnas (P<0.05)

Tabla 2 - Relación entre el diámetro folicular y ovocitario en cabras

DIÁMETRO FOLICULAR	Nº	DIÁMETRO OVOCITARIO (MEDIA ± SEM)
2-3 mm	22	135.91±1.58[a] µm
3-5mm	23	133.03±1.36[a] µm
> 5mm	66	135.68±0.76[a] µm

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alberio, R., Olivera J., Roche, A., Alabart, J., Folch, J. 2002. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. Small Rumiant Research, 46, 81-87. •Arlotto, T., Schwartz J.L., First N.L., Leibfried-Rutledge M.L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. Theriogenology, 45: 943-956. • Armstrong, D.T.2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. Theriogenology, 55: 1303-1322.• Baldassarre, H., Fumus, C.C., de Matos, DG., Pessi, H. 1996. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. Theriogenology, 45: 707-717. • Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, MP.1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. Journal of Reproduction and Fertility, 103: 293-298. • Crozet, N., Dahirel, M., Gall, L. 2000. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. Journal of Reproduction and Fertility, 118: 367-373. • Kauffold, J., Amer, AH., Bergfeld, U., Weber, W., Sobiraj, Al. 2005. The in vitro developmental competence of oocytes from Juvenile calves is related to follicular diameter. Journal of Reproduction and Development, 51, 325-332. •Marquant-Le Guienne. 1999. Atlas of the bovine oocyte. AETE Newsletter, 10, 6-8. • Martino, A., Mogas, T., Palomo, MJ., Paramio MT. 1994. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. Theriogenology, 41: 969-980.• Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio MT 1995.. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. Theriogenology, 43, 473-485. • Mogas, T., Palomo, M., Izquierdo, D., Paramio MT.1997. Developmental capacity of in vitro matured and fertilized prepubertal goat oocytes. Theriogenology, 47, 1189-1203. • Pierson, J., Wang, B., Neveu, N., Sneek, L., Côté, F., Karatzas, CN., Baldassarre, H. 2005. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. Reproduction Fertility and Development, 16: 795-799. • Roche,A. 2005. Estudio sobre la obtención de oocitos mediante laparoscopia en ovejas y cabras adultas. Tesis Doctoral.