



**Universidad Autónoma de Ciudad Juárez**

**Instituto de Ciencias Biomédicas**

**Departamento de Ciencias Veterinarias**

**Maestría en Ciencia Animal**

**Coloquio Institucional de Posgrados 2020**

**Tema de presentación: “Evaluación de la suplementación de hormonas  
secuenciales y cafeína sobre la maduración *in vitro* de ovocitos caninos (*Canis  
familiaris*)”**

MVZ. Bianca Viviana Orozco Galindo

Ciudad Juárez Chih., 25 de noviembre 2020

## **Introducción**

La producción in vitro (PIV) de embriones se ha convertido en una técnica muy frecuente hablando de grandes especies como bovinos. El éxito en PIV y la demanda de la misma han aumentado considerablemente en los últimos años, no obstante, en animales los cánidos, la PIV no es frecuente y se enfrenta con el obstáculo fisiológico para la obtención de embriones, resaltando la maduración in vitro (MIV), ya que representa el principal factor limitante en el desarrollo adicional de tecnología de reproducción asistida en caninos salvajes como domésticos (Chastant *et al.*, 2012). Esto se debe a que la reanudación de la meiosis es altamente específica en los caninos, en comparación con otros mamíferos y los ovocitos se ovulan en la etapa de vesícula germinal (VG) y completan su maduración nuclear después de 2 a 3 días en el oviducto (Chastant *et al.*, 2012). Por lo anterior, la generación de un medio óptimo para la MIV de ovocitos caninos tratando de simular la fisiología reproductiva ha sido un reto y con bajos porcentajes de éxito. El establecer condiciones adecuadas para la maduración de los ovocitos en la perra, requerir un enfoque diferente en las condiciones in vitro del medio, basadas no solo en el microambiente folicular sino en el oviductal, al igual que las distintas concentraciones y tiempos de exposición hormonal hacia el ovocito (Evecen *et al.*, 2011). Por lo que, el objetivo general es evaluar el efecto de la suplementación de hormonas secuenciales y cafeína en la MIV de ovocitos de canino doméstico, simulando y coadyubando el microambiente ovárico y oviductal, como objetivos específicos es evaluar la maduración nuclear de los distintos grupos experimentales.

## **Marco teórico**

Los cánidos son monoéstricos, es decir, presentan un solo evento ovulatorio y ciclo estral por temporada de reproducción, debido a la domesticación de los caninos domésticos (*Canis familiaris*) la estacionalidad no es tan marcada como en caninos salvajes (Valdespino *et al.*, 2007). Las secreciones hormonales controlan el ciclo estral, por lo que el uso de hormonas en la suplementación de los medios de cultivo in vitro es indispensable, tomando en cuenta los eventos más importantes durante el ciclo tal como el aumento continuo de estradiol durante el proestro desencadena un aumento de LH

seguido de la ovulación (Concannon, 2011) luego del pico preovulatorio el ovocito está expuesto a una alta concentración de progesterona en el entorno folicular (Babu *et al.*, 2016), ya que hay una relación estradiol-progesterona en la que si aumenta el estradiol disminuyen los niveles de la progesterona (Moon *et al.*, 2018), los niveles de progesterona se mantienen altos por acción del cuerpo lúteo (Miranda *et al.*, 2018) y dos días después del aumento de LH, ovocitos en etapa de vesícula germinal (VG) se ovulan en el oviducto (Carlson, 2008; Nagashima *et al.*, 2019) los ovocitos en VG completan la maduración nuclear después de 2 a 3 días en el oviducto (Luvoni, 2000) y solo aproximadamente el 20% de los ovocitos caninos pueden completar la reanudación meiótica después de 24-96 h de incubación (Hu *et al.*, 2019). La expansión de las células del cúmulo es indicador de maduración citoplasmática en mamíferos y se utiliza para determinar las tasas de maduración de ovocitos, sin embargo, la expansión de las células del cúmulo es rara y parece ser insignificante para la MIV de los ovocitos de perro (Demir *et al.*, 2019). La reanudación de la meiosis es altamente específica en los cánidos, las disminuciones en la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) permiten la reanudación de la meiosis, esto se debe a la liberación de ovulación preovulatoria de LH, que induce una disminución en el AMPc dentro de los ovocitos (Ramos *et al.*, 2018). Las concentraciones de AMPc se controlan mediante la modulación de su síntesis por la adenililciclase (AC), la enzima ATPpirofosfatasalasa, que convierte el trifosfato de adenosina (ATP) a AMPc y pirofosfato en el ovocito (Ramos *et al.*, 2018). Se cree que diferentes vías actúan sobre los cambios en la concentración de AMPc dentro de los ovocitos a través de receptores de LH, vías intracelulares de calcio y fosfodiesterasas, por lo tanto, el uso de inhibidores de la fosfodiesterasa como las metilxantinas (cafeína o teobromina) se ha aplicado durante la maduración de los ovocitos para mejorar su maduración nuclear in vitro (Salavati *et al.*, 2013). Es por esto que se han establecido estrategias para aumentar los porcentajes de la MIV por medio de la suplementación en medio de cultivo, ya sea con antioxidantes, hormonas, inhibidores meióticos y/o factores de crecimiento (Hu *et al.*, 2019).

## **Diseño metodológico**

### *Especímenes y colecta ovárica*

Los químicos utilizados fueron de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA), al menos que se marque lo contrario.

En la Clínica de Esterilización Especializada (CEE) se colectaron los ovarios de 10 perras luego de una ovariectomía bajo los lineamientos del Comité Institucional de Ética y Bioética de la UACJ.

Se colectaron los ovarios en solución salina a 0.9% NaCl a 30-34°C. Posterior a la cirugía, se le realizó un hisopado a las perras anestesiadas para una citología vaginal, esto mediante el frotado con un hisopo estéril en la vagina de la perra. Los ovarios fueron transportados al laboratorio de Reproducción animal en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la UACJ.

### *Recuperación de ovocitos*

Los ovarios colectados fueron lavados con solución salina 0.9% NaCl a 34°C para posteriormente ser macerados con un escalpelo No. 15 en una caja Petri 90 mm en 6 mL de TCM199 con sales de Eagle suplementado con suero fetal bovino (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) al 1% para liberar los ovocitos.

### *Diseño Experimental*

Se establecieron cuatro grupos experimentales: grupo control (A), solo con el medio de maduración convencional; grupo (B), medio convencional adicionado con hormonas en un esquema secuencial: 0-24 h FSH 2 µg/mL + Estradiol 20 µg/mL, 24-48 h FSH 2 µg/mL + Estradiol 20 µg/mL + LH 1 µg/mL, 48-72 h FSH 10 µg/mL + Estradiol 5 µg/mL + LH 10 µg/mL + Progesterona 4 µg/mL, 72-96 h FSH 2 µg/mL+ Progesterona 2 µg/mL; grupo (C), medio convencional adicionado con cafeína 10 mM de 0- 24 h, y grupo (D), hormonas secuenciales en el mismo esquema descrito anteriormente más cafeína.

### *Maduración in vitro*

Después de liberar los ovocitos en la caja Petri 90 mm, dentro de la campana de flujo en un ambiente estéril con ayuda del estereoscopio se buscaron y tomaron los ovocitos con una micropipeta de 10  $\mu$ L para colocarlos en una caja Petri 35 mm con 2 mL de TCM199 con FBS, fueron seleccionados los ovocitos calidad I (con más de dos capas de células del cúmulo y citoplasma oscuro granulado), II (con dos capas de células del cumulo y citoplasma ligeramente oscuro granulado) y los mejores de calidad III (con citoplasma relativamente homogéneo) según Hewitt et al., (1998) en una caja Petri 35 mm con 2 mL de TCM199 con FBS, luego se tomaron los ovocitos de calidad I y II como selección final como la mejor calidad, y fueron puestos en una caja Petri 35 mm con 2 mL de TCM199 con FBS.

Los ovocitos calidad I y II fueron puestos a madurar en una caja de cuatro pozos con 45 ovocitos por pozo en medio TCM199 con 500  $\mu$ L suplementado con suero albumina bovina (BSA, 4%), piruvato de sodio (Gibco, Grand Island, NY, USA) 50  $\mu$ g/mL, gentamicina 50  $\mu$ g/mL a 38.5 °C en un ambiente humidificado de 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora modular (MIC-101, Billups-Rothenberg, San Diego, USA). Posteriormente en cada uno de los pozos se marcaron con el grupo experimental correspondiente y se aplicó el tratamiento hormonal cada 24 h y cafeína las primeras 24 h, según como anteriormente fue descrito.

### *Evaluación de la maduración*

Para la evaluación nuclear, luego de las 96 h de tratamiento en MIV, los COCs fueron lavados con PBS y desnudados con 0.2% de hialuronidasa. Los COCs ya desnudos y posteriormente lavados fueron colocados en un portaobjetos con una cantidad mínima de medio y luego cubierta por 10  $\mu$ L de solución Hoechst 33342. Después de 5 minutos de incubación en la oscuridad, se retiró la solución de Hoechst y se cubrieron los ovocitos con un medio de montaje acuoso Fluoromount. Los ovocitos se observaron luego con un microscopio de epifluorecencia (Olympus), se evaluó la cromatina, considerando la longitud de onda de excitación máxima de Hoechst 33342 (Morselli *et al.*, 2018).

Para la evaluación de la maduración nuclear se tomó en cuenta los distintos estadios de la maduración nuclear de los ovocitos: (1) Vesícula germinal (GV) que es la identificación del nucléolo y filamentos muy finos de cromatina, (2) descomposición de vesículas

germinales (GVBD) en la cual se observa la condensación de cromatina, (3) Metafase I (MI) los cromosomas se acomodan en el hemisferio del ovocito, (4) Metafase II (MII) los dos grupos de cromosomas que se mueven a los extremos opuestos del huso meiótico indicador del último estadio de la maduración (Hewitt et al., 1998; Bolamba et al., 1998).

### *Análisis estadístico*

Las variables de respuesta que se evaluaron fueron los distintos estadios usados para determinar la maduración nuclear de los ovocitos: A) Vesícula germinal (VG), B) destrucción de la vesícula germinal (GVBD), C) metafase I (MI) y D) metafase II (MII), las cuales son de tipo categórico.

El análisis de los datos fue mediante una prueba de Chi cuadrada o una prueba exacta de Fisher (cuando el 75% de las celdas en las tablas de contingencia construidas no presenten valores >5) y se realizará utilizando el paquete estadístico SAS (V. 9.0 para Windows).

### **Resultados de práctica**

Debido a la pandemia global del 2020, se vió limitado el trabajo de laboratorio por lo que solo fue posible realizar la primera y única práctica con todos los grupos experimentales luego de que se hayan reunido todos los reactivos a trabajar.

El día 17 de octubre se realizó la colecta número 8 en la cual se dio todo el seguimiento correspondiente al diseño experimental, pasadas las 96 h se evaluó la maduración con el microscopio de epifluorecencia, sin embargo, ya que se realizaba por primera vez la evaluación nuclear, el tiempo de manipulación fue excesivo y solo se logró evaluar el grupo A y B, teniendo como evidencia solamente del grupo B (Figura 1). Otra problemática que se presentó durante la evaluación de la maduración nuclear, fue la sobretinsión de las muestras por lo que esto dificultó la evaluación, solo es posible especular que en la Figura 1 se logra apreciar un ovocito posiblemente en etapa de MII por lo que podría ser la presencia del cuerpo polar, sin embargo, debido a todas las

problemáticas que se presentaron estos no pueden ser presentados como resultados precisos del experimentos sino que solo como resultados de la práctica.



Figura 1. Grupo B, ovocitos teñidos con Hoechst 33342 después de las 96 h de maduración.

## Referencias

- Babu, T. R., K. R. C. Reddy, K. C. S. Reddy, V. G. Kumar, R. Amin, G. Arunakumari and A. Teja. 2016. Evaluation of effective approach for in vitro maturation of canine oocytes with sequential addition of hormones. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 24-27.
- Bolamba, D., K. D. Borden-Russ and B. S. Durrant. 1998. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 933-942
- Carlson, D. A. 2008. Reproductive biology of the Coyote (*Canis latrans*): Integration of behavior and physiology. All Graduate Theses and Dissertations. 104.
- Chastant-Maillard S., M. Saint-Dizier, B. Grimard, M. Chebrou, S. Thoumire and K. Reynaud. 2012. Are Oocytes from the Anestrous Bitch Competent for Meiosis? *Reproduction in Domestic Animals*, 74–79.
- Concannon, P. W. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 200-210.
- Demir, K., M. Evecen, R. Arici, S. Yağcıoğlu, N. Ersoy, N. Çoşkun, H. Atalla, K. Ak, S. Birler and S. Pabuccuoğlu. 2019. In vitro effect of recombinant human gonadotropins on meiotic competence of dog oocytes. *Journal of veterinary and animal sciences*, 469-473.
- Evecen, M., U. Cirit, K. Demir, A. I. Hamzaoglu, G. Bakırer, S. Pabuccuoglu and S. Birler. 2011. Adding hormones sequentially could be an effective approach for IVM of dog oocytes. *Theriogenology*, 1647–1651.
- Hewitt, D. A., P. F. Watson and G. C. W. England. 1998. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology*, 1083-1101.
- Hu M., Z. Du, Z. Zhou, H. Long y Q. Ni. 2019. Effects of serum and follicular fluid on the in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.040>

Luvoni, G. C. 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reproduction Nutrition Development*, 505–512.

Ramos, L. G., C. A. S. Monteiro, J. M. G. Souza-Fabjan, C. O. P. Basconcelos, L. A. G. Nogueira, A. M. R. Ferreira and R. V. Serapião. 2018. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte in vitro maturation in domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 1-14.

Miranda, S., N. Carolino, H. Vilhena, R. Payan-Carreira and R. M. N. L. Pereira. 2018. Early embryo development, number, quality, and location and the relationship with plasma progesterone in dogs. *Animal Reproduction Science*, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.10.001>.

Moon, M. H., F. A. Ahmed, K. Lalrintluanga, D. J. Talukdar, P. J. Doley, S. K. Behera and K. Sarma. 2018. The role of estrogen and progesterone hormone on vaginal cytology in bitch. *International journal of livestock research*, 2277-1964.

Morselli, M. G., M. Loiacono, M. Colombo, M. Mortarino and G. C. Luvoni. 2018. Nuclear competence and genetic expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9) of canine oocytes in 3D culture. *Reproduction in Domestic Animals*, 117-124.

Nagashima, J. B., A. J. Travis and N. Songsasen. 2019. The Domestic Dog Embryo: In Vitro Fertilization, Culture, and Transfer. *Comparative Embryo Culture*, 247-267.

Salavati, M., F. Ghafari, T. Zhang and A. A. Fouladi-Nashta. 2013. Influence of caffeine pretreatment on biphasic in vitro maturation of dog oocytes. *Theriogenology*, 784-792.

Valdespino C. 2007. Physiological Constraints and Latitudinal Breeding Season in the Canidae. *Physiological and Biochemical Zoology*. 580–591.