



VIABILIDAD DE OVOCITOS VITRIFICADOS Y MADURADOS *IN VITRO* DE GATA DOMÉSTICA ADULTA (*Felis catus*) EN ESTACIÓN REPRODUCTIVA

Calvo Juan J.¹, Lombide Paula¹, Robert Deborah.¹, Viqueira Mónica.¹

¹. Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Área Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Alberto Lasplaces 1620. CP 11600. Tel. 0598 26222933. Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCION: La biodiversidad ha descendido en el planeta y tenemos que buscar mejores estrategias para su preservación. La disminución o desaparición de una especie no está siempre asociada a la reducción de su hábitat, sino a la falta de alimentación, exceso de caza o problemas de carácter sanitario [1]. Las biotecnologías reproductivas se pueden aplicar a programas de conservación de especies en peligro de extinción. Si bien se han obtenido importantes avances en el conocimiento de la fisiología de los animales silvestres, aun persisten limitantes para una mayor eficiencia felinos salvajes [2]. El gato doméstico (*Felis catus*) es el único de las 37 especies de la familia *felidae* que no vive amenazado o en peligro de extinción y viene siendo utilizado como modelo biomédico en programas de reproducción asistida por pequeños y grandes felinos silvestres [3,4]. La supervivencia de los ovocitos es muy variable y su criopreservación se ha logrado con diverso éxito en las especies en que ha sido aplicada, incluyendo el gato doméstico. Aunque han nacido gatos utilizando estas biotecnologías reproductivas sigue siendo necesario mayores investigaciones [5,6] ya que todavía no se considera a la criopreservación una herramienta confiable y repetible [7,8].

OBJETIVO : Determinar la viabilidad de ovocitos vitrificados y madurados *in vitro* de gata doméstica adulta en estación reproductiva.

METODOLOGÍA: Los ovarios fueron obtenidos por ovariectomía de hembras adultas en buen estado nutricional y sin tratamientos hormonales y transportados al laboratorio dentro de las dos horas posterior en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) con gentamicina (100 µg/ml) y refrigerados a 4 °C. Se fragmentaron por microdissección, con tijera y escalpelo, en caja de Petri de 90mm con solución de buffer fosfato salino modificado (m-PBS) suplementado con suero de ternero inactivado (CS) y antibióticos (ATB). Los complejos cúmulo-ovocitos (CCOs) liberados fueron colectados bajo microscopio estereoscópico con pipetas Pasteur estériles y transferidos a caja de Petri de 35 mm con igual solución utilizada durante la microdissección (Figura 1). Los CCOs obtenidos fueron clasificados en cuatro categorías [9]. Solo los CCOs de grado A y B fueron utilizados (3 o más capas de células de la granulosa, integridad de la zona pelúcida y citoplasma homogéneo y oscuro) para la vitrificación (Figura 2) y posterior maduración *in vitro*. Los CCOs fueron vitrificados con soluciones de etilenglicol (1,5 M) en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con sucrosa 0,1 M, medio de cultivo tisular Hepes (TCM-199), vitelo, ATB y CS (Tabla 1) en cuarenta y seis pajuelas de 0.25 ml (Figura 2) con 10-12 CCOs cada una y almacenados por treinta días en termo de nitrógeno líquido (N₂) a -196°C (Figura 3).

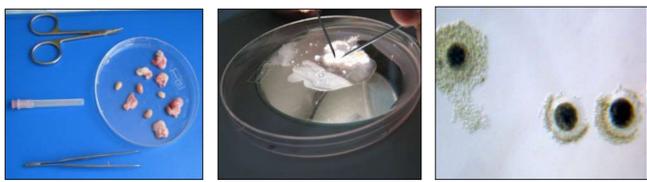


Figura 1 . Obtención de ovocitos

	TCM -199	CS	ATB	VITELO	SUCROSA	ETILENGLICOL
Lavado (W)	✓	✓	✓			
Diluyente (D)	✓	✓		✓	✓	
Equilibramiento (E)	✓	✓	✓			✓
Vitrificación (V)		✓	✓		✓	✓

Tabla 1 . Soluciones de vitrificación



Figura 2 . Pajuelas de 0.25 ml



Figura 3 . Termo de Nitrógeno Líquido

Posteriormente se desvitrificaron 39 pajuelas, (Figura 4) Los CCOs recuperados fueron madurados *in vitro* (MIV) en gotas (50 µl) de medio de cultivo TCM 199 con 10% de CS y ATB, cubiertas con aceite mineral estéril, a 38°C, con 99% de humedad relativa y atmósfera de anhídrido carbónico (CO₂) al 5% por 48 hrs. Se descartaron los que mostraron degeneración y con los que mostraron buena expansión del cúmulo, citoplasma uniforme y oscuro e integridad de la zona pelúcida se incluyeron en gotas para su maduración *in vitro* (Figura 5).

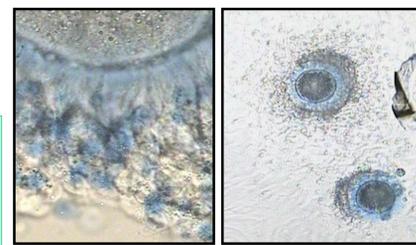


Figura 7. Inclusión del Azul Tripán

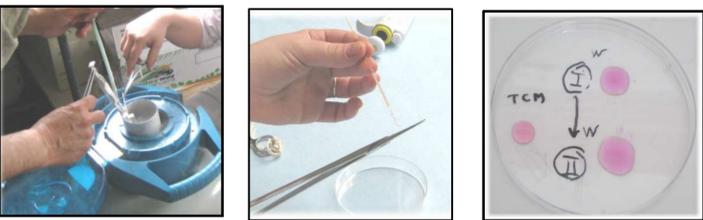


Figura 4. Desvitrificación y lavado de los CCOs



Figura 5. Maduración de Ovocitos

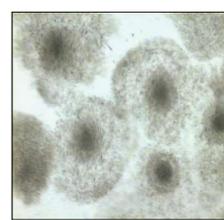


Figura 6 MTT Positivo

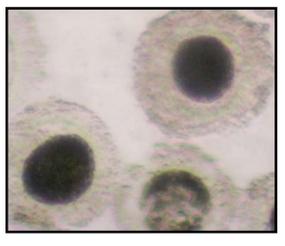
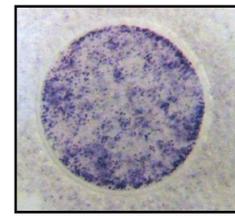


Figura 8. Azul Tripán Negativo

Para la evaluación de la viabilidad de los CCOs se utilizaron dos procedimientos: 1) la incubación con **MTT** [10], los CCOs se colocaron individualmente mediante pipeta Pasteur en cada cava de una placa de ELISA-96, con 10 µl de solución madre de MTT en 100 µl de m-PBS e incubados durante 4 horas a 37°C, 5% CO₂ y 99% de humedad. El MTT incoloro o débilmente amarillento al ser reducido por las enzimas deshidrogenasa de las mitocondrias cambia a azul oscuro. Según la respuesta observada de los CCOs, se clasificaron como positivo (Figura 6) en aquellos que presentaron cambio en la coloración y como negativo donde no se manifestó dicho cambio.

2) La incubación con **Azul Tripán** al 0,4%. Los CCOs se colocaron individualmente mediante pipeta Pasteur en cada cava de una placa de ELISA-96, con µl de solución de Azul Tripán 0,4% en 100 µl de m-PBS e incubados durante 5 minutos a 37°C, 5% CO₂ y 99% de humedad. El Azul Tripán penetra en las células que tienen alterada la membrana plasmática, las que se observan azules (Figura 7), no penetra en las células vivas (Figura 8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: 508 CCOs grados A y B fueron recuperados mediante la microdissección de 33 ovarios de gata en estación reproductiva con un promedio por ovario fue de 15,39 ± 0,84. Se evaluó la viabilidad de 270 CCOs en ambos ensayos. Los resultados se expresan en la siguiente tabla .

CCOs	Obtenidos y Vitrificados	Madurados <i>in vitro</i>	Descartados	Evaluados MTT	Evaluados Azul Tripán	MTT (+) N° (%)	A. Tripán (-) N° (%)
N°	508	320	50	140	130	78 (56)	69 (53)

Durante la vitrificación los CCOs sufrieron daño morfológico y funcional que son críticos para su posterior desarrollo [7]. La utilización de los ensayos de viabilidad ratifican los porcentajes reportados previamente [8].

CONCLUSIÓN: La vitrificación comprometió la integridad de un importante número de CCOs aunque más del 50 % respondió favorablemente, mostrando signos de viabilidad esperados. Es necesario mejorar los protocolo de experimentación para incrementar el porcentaje de viabilidad.

LITERATURA CITADA:

- [1] Roldán E., Garde J. (2004) Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. *Museo Nacional de Ciencias Naturales*. Madrid. España pp 307 - 338.
- [2] Franzosi Mattos, M.R., Simoes-Mattos, L., Machado de Silva, L.D. (2003) Embryo technology in the domestic cat (*Felis catus*) *Vet. Mex.*, 34 (4) 373 - 388.
- [3] Jewgenow, K., Paris, M.C.J. (2006) Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology* 66, 93 - 100.
- [4] Pope, C.E. (2000) Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 53, 163-174.
- [5] Cocchia N., Ciani, F., Russo, M., El Rass, R., Rosapane, I., Avallone, L., Tortora, G., Lorizio, R. (2010) Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture. *Criobiology* 60, 229 - 234.
- [6] Pope, C.E., Gomez, M.C., Kagawa, N., Kuwayama, M., Leibo, S.P., Dresser, B. L. (2012) In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. *Theriogenology* 77. 531 - 538.
- [7] Apparicio, M., Ruggeri, E., Luvoni, G.C. (2013) Vitrification of immature feline oocytes with a commercial kit for bovine embryo vitrification. *Reprod Dom Anim* 48, 240 - 244.
- [8] Mikolajewska, N. Muller, K, Nizanski, W. Jewgenow, K. (2012) Vitrification of domestic cat oocytes - Effect on viability and integrity of subcellular structures. *Reprod. Dom. Anim* 47 (Suppl.6), 295 - 299.
- [9] Wood, T.C, Wildt, D.E. (1997) Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize, and develop into blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 110, 355 - 360.
- [10] Calvo, J., Pérez, V., Fila, D., Campos, E. (2004) Evaluación de la viabilidad de ovocitos bovinos seleccionados para maduración y fertilización *in vitro* mediante la utilización del MTT. *Veterinaria (Montevideo)* 39 (154) 7 - 10.