

Efectos de diferentes métodos de estimulación ovárica en ratas adultas

A. Carreras*, C. Mendoza y C. Osorio

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
18012 Granada (España)

(Recibido el 17 de febrero de 1987)

A. CARRERAS, C. MENDOZA and C. OSORIO. *Effects of Different Methods of Ovarian Stimulation in Adult Rats*. Rev. esp. Fisiol., 44 (1), 17-20, 1988.

The *in vitro* fecundation programs normally use different ovarian stimulation agents. The purpose of the present study was to compare the effects of some of these agents on indices of ovulation and serum levels of estradiol, progesterone, and FSH. Treatments studied consisted of clomiphene citrate, PMSG alone and in combination with clomiphene citrate, pure human FSH and epimestrol. The data obtained show PMSG alone and PMSG plus clomiphene citrate to be the most effective treatments, in terms of number of oocytes harvested. No differences were noted between serum levels of oestradiol, progesterone and FSH.

Key words: Ovarian stimulation, PMSG, Clomiphene citrate, Pure FSH, Epimestrol.

Los tratamientos de estimulación ovárica han adquirido una gran importancia, tanto en el estudio de la reproducción animal (11) como en los programas de fecundación *in vitro* (FIV) en humanos (3, 6). El objeto de obtener el mayor número de ovocitos de buena calidad, que tras ser fertilizados produzcan un embrión viable y preparar un medio ambiente uterino adecuado para la implantación de estos embriones.

El propósito de nuestro estudio es el análisis de diferentes protocolos de estimulación ovárica en ratas, evaluando la producción de ovocitos y los niveles en suero de estradiol, progesterona y FSH.

Material y Métodos

Se han utilizado ratas Wistar hembras adultas de 180-200 g de peso, mantenidas en una habitación con temperatura constante y luz fluorescente desde las 07 a las 19 horas, alimentadas con pienso de laboratorio estándar y agua *ad libitum*.

Mediante frotis vaginal se determinó el día del estro, que se consideró como día 0. A las 12 horas del día 1, las ratas fueron inyectadas (i.p.) con los siguientes tratamientos, en un volumen de 0,2 ml: *Grupo 1*: 20 UI de PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin) (Sigma). *Grupo 2*: 10 mg de CC (citrato de clomifeno) (Clomifen, Casen). *Grupo 3*: 5 mg de CC. *Grupo 4*: 1 mg de CC. *Grupo 5*:

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

20 UI de PMSG más 10 mg de CC. *Grupo 6:* 20 UI de FSH humana pura (h-FSH) (Metrodine, Serono, Francia). *Grupo 7:* 0,5 mg de epimestrol (Alene, Organon). *Grupo 8:* Control a los que se les inyectó 0,2 ml de suero salino.

La ovulación fue inducida en todos los grupos mediante inyección i.p. de 30 UI de hCG (human Corionic Gonadotrophin) (Profasi, Serono) a las 9 horas del día 3.

Los animales se decapitaron a las 10 horas del día 4 y la sangre recogida del tronco del animal se centrifugó y el suero se conservó a -20° C hasta el análisis. Se extirparon los oviductos y se sacó la masa del cumulus del ampulla en medio de cultivo, se disgregaron las células del cumulus con hialuronidasa al 0,1 % en medio de cultivo para liberar los ovocitos y evaluar su número.

Los niveles de estradiol (E_2) y progesterona (P) en suero se midieron por radioinmunoanálisis utilizando los kits comerciales de Sorin Biomedica (Italia), y los niveles de hormona foliculoestimulante de rata (r-FSH) se determinaron utilizando los reactivos proporcionados por el NIAMDD (USA).

El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante el test de Kruskal-

Wallis para los resultados del número de ovocitos y el análisis de varianza de una vía para el resto de los resultados. A todos los grupos se les aplicó el test de Bonferroni y se hicieron todas las comparaciones por parejas mediante el método de Newman-Keuls.

Resultados

La tabla I muestra los resultados de los diferentes tratamientos en 7 de los grupos experimentales. En el grupo 2, tratado con 10 mg de CC, no se recogió ningún ovocito en ninguno de los animales de este grupo.

El número de ovocitos recogidos en los grupos tratados con PMSG sola o en combinación con CC fue significativamente mayor que en el resto de los grupos, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre ellos, ni entre los otros grupos experimentales.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles en suero de E_2 y P entre los diferentes grupos.

Los niveles de r-FSH fueron superiores en el grupo tratado con h-FSH respecto a los de los grupos tratados con 1 mg de

Tabla I. Ovocitos por rata y niveles séricos de estradiol (E_2), progesterona (P) y FSH en los grupos estudiados.

Los datos se expresan en media \pm SEM. n = número de animales por grupo.

Tratamiento	(n)	Ovocitos n.º	E_2 pg/ml	P ng/ml	r-FSH ng/ml
PMSG (20 UI)	8	22,5 \pm 3,6 a, b, c, d, e	77,3 \pm 5,3	19,5 \pm 3,2	1,02 \pm 0,13
CC (5 mg)	5	2,2 \pm 1,1 ^{a, f}	72,2 \pm 8,7	18,7 \pm 4,1	1,36 \pm 0,33
CC (1 mg)	5	4,8 \pm 0,6 ^{b, g}	71,8 \pm 8,7	25,8 \pm 2,9	0,69 \pm 0,21 ^k
PMSG (20 UI) + CC (10 mg)	12	30,7 \pm 3,2 ^{f, g, h, i, j}	90,6 \pm 4,9	24,6 \pm 3,2	1,24 \pm 0,11
h-FSH pura (20 UI)	7	5,0 \pm 0,8 ^{c, h'}	65,9 \pm 10,0	24,9 \pm 5,0	1,80 \pm 0,42 ^{k, l}
Epimestrol (0,5 mg)	5	5,9 \pm 0,7 ^{d, i'}	64,6 \pm 3,1	11,5 \pm 1,8	0,91 \pm 0,18
Suero salino	8	7,6 \pm 0,6 ^{e, j'}	73,5 \pm 4,4	20,8 \pm 2,2	0,71 \pm 0,15 ^l

a vs a'; f vs f'; g vs g'; h vs h': p > 0,01

b vs b'; c vs c'; d vs d'; e vs e'; i vs i'; j vs j'; k vs k'; l vs l': p > 0,05

CC y el grupo control, no encontrándose diferencias significativas entre el resto de los grupos.

Discusión

El tratamiento con CC (10 mg), produjo un efecto inhibitor sobre la ovulación en ratas al ser administrado según nuestro protocolo, no obteniéndose ningún ovocito.

El tratamiento más efectivo en cuanto al número de ovocitos obtenidos, fue el realizado con PMSG sola o en combinación con CC.

La acción del CC puede estar ejercida a dos niveles diferentes: a nivel del hipotálamo, inhibiendo la retroalimentación negativa de los estrógenos (10), aumentando la secreción de GnRH (8), o a nivel de la propia hipófisis, aumentando su sensibilidad al GnRH (1). También podría actuar negativamente, como anti-estrógeno, directamente sobre la foliculogénesis ovárica (7).

En la rata, el CC a las dosis aquí utilizadas actuaría preferentemente a nivel del ovario, ejerciendo una inhibición de la oogénesis. El CC inhibe *in vitro* la maduración de los folículos de rata y su actividad esteroideogénica (5), y en el ratón disminuye el número de ovocitos ovulados, aumentando la proporción de ovocitos degenerados (4).

El efecto inhibitor de la ovulación del CC en ratas no se manifestó al administrarlo en combinación con PMSG, ni se encontró diferencias significativas entre los grupos tratados con PMSG sola y PMSG más CC.

Este efecto inhibitor del CC en ratas podría quedar enmascarado por la respuesta del ovario a la acción de la PMSG; en las condiciones hormonales creadas por el tratamiento con PMSG, el CC podría actuar de forma diferente.

Los tratamientos con h-FSH o con epimestrol dieron resultados similares a los obtenidos en el grupo control respecto al

número de ovocitos, quizá por las dosis utilizadas o porque la pauta de administración no sean las adecuadas, o al hecho de que en la rata sea importante una relación FSH/LH en el desarrollo de los folículos del ovario.

Los niveles de E_2 en suero dependen del número de folículos maduros y de la capacidad esteroideogénica de éstos. En la mujer se ha encontrado relación entre los niveles séricos de E_2 durante la fase periovulatoria y la proporción de embarazos obtenidos por fecundación *in vitro*, siendo estos niveles un indicador de la calidad del ciclo estimulado (2). Algunos autores indican que una secreción excesiva de estrógenos puede tener efectos adversos sobre la maduración del ovocito (9).

En nuestro estudio no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de E_2 y P entre los grupos estudiados, ni correlación entre los niveles séricos de E_2 y el número de ovocitos.

Los niveles de r-FSH en suero fueron superiores en el grupo tratado con h-FSH que en el tratado con 1 mg de CC y que en el control.

Las diferencias analíticas entre la h-FSH y la r-FSH y el tiempo transcurrido entre la administración de h-FSH y la determinación de r-FSH hacen que este aumento en los niveles de FSH no pueda ser debido a la detección directa de la FSH inyectada.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las Srtas. R. Arcas y M. Quintana, por su colaboración técnica y al NIAMDD (USA) por suministrar los reactivos para el radioinmunoanálisis de r-FSH.

Resumen

Se comparan los efectos de algunos agentes utilizados en los programas de fecundación *in vitro* como estimulantes de la ovulación, sobre las tasas de ovulación y los niveles en suero de estradiol,

progesterona y FSH. Los resultados de los tratamientos con citrato de clomifeno, PMSG sola o en combinación con citrato de clomifeno, FSH humana pura y epimestrol, indican que los más efectivos, en cuanto al número de ovocitos recogidos, son los de PMSG sola o en combinación con citrato de clomifeno. No se encuentran diferencias entre los niveles en suero de estradiol, progesterona y r-FSF.

Palabras clave: Estimulación ovárica, PMSG, Citrato de clomifeno, FSH pura, Epimestrol.

Bibliografía

1. Adashi, E. Y., Hsueh, A. J. W., Bambino, T. H. y Yen, S. S. C.: *Am. J. Physiol.*, 240, E125-E129, 1981.
2. Dlugi, A. M., Laufer, N., DeCherney, A. H., MacLusky, N. J., Haseltine, F. P., Polan, M. L., Mezer, H. C., Tralatzis, B., y Naftolin, F.: *Fertil. Steril.*, 41, 530-537, 1984.
3. García, J. E., Jones, G. S., Acosta, A. A. y Wright, G. Jr.: *Fertil. Steril.*, 39, 167-171, 1983.
4. Laufer, N., Pratt, B. M., DeCherney, A. H., Naftolin, F., Merino, M. y Market, C. L.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 147, 633-637, 1983.
5. Laufer, N., Reich, R., Braw, R., Schenker, J. G. y Tsafirri, A.: *Biol. Reprod.*, 27, 463-466, 1982.
6. Lopata, A.: *Fertil. Steril.*, 40, 289-293, 1983.
7. Marut, E. L. y Hodgen, G. D.: *Fertil. Steril.*, 38, 100-104, 1982.
8. Miyake, A., Aono, T., Minagawa, J., Kawamura, Y. y Kurachi, K.: *Fertil. Steril.*, 34, 172-176, 1980.
9. Moor, R. M., Osborn, J. C. y Crosby, I. M.: *J. Reprod. Fert.*, 74, 167-172, 1985.
10. Vaitukaitis, J. L., Bermúdez, J. A., Cargille, C. M., Lipset, M. B. y Ross, G. T.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 32, 503-507, 1971.
11. Walton, E. A. y Armstrong, E.: *J. Reprod. Fert.*, 67, 309-314, 1983.