Progresión meiótica de ovocitos de cabras prepúberes tras la tinción con Hoechst 33342 y la exposición a luz UV

Velilla,E., López-Béjar, M., Rodríguez -González, E., Oter, M., Vidal, F., Paramio, M .

INTRODUCCION

En los últimos años, el fluorocromo Hoechst 33342 ha sido ampliamente utilizado con diferentes objetivos en el ámbito de la embriología: para la visualización de placas metafásicas antes de la enucleación ovocitaria en diferentes especies (Westhusin *et al.*, 1990, 1992; Bethauser *et al.*, 1993), para visualizar la organización espacial de la cromatina *in vivo* tanto en ovocitos como en zigotos de ratón (Debey *et al.*, 1989, 1993; Zuccoti *et al.*, 1995), para analizar la fusión ovocito-espermatozoide (Green., 1992), para la observación de las fases inciales de la fecundación (Flaherty *et al.*, 1995), para diferenciar el estadio de desarrollo de ovocitos y embriones preimplantacionales (Sawicki and Mystkowska, 1990; Gall *et al.*, 1996) y para observar la progresión meiótica y mitótica de ovocitos y embriones en especies no mamíferas (Stricker y Schatten, 1989; Stricker, 1995).

A pesar de que la tinción Hoechst 33342 ha sido considerada por algunos autores como una tinción vital del DNA tras una corta exposición a luz ultravioleta (UV), necesaria para la excitación del Hoechst (Hinkley *et al.*, 1986; Debey *et al.*, 1989), es conocido que tanto la concentración utilizada como el tiempo de exposición a la luz UV y el tipo celular son factores determinantes en la viabilidad ovocitaria y embrionaria. La tinción con Hoechst y la posterior exposición a la luz UV necesaria para visualizar los cromosomas podría ser una herramienta útil para evaluar diferentes aspectos de la maduración ovocitaria en combinación con otros fluorocromos citoplasmáticos vitales. Así, los objetivos planteados en este estudio fueron: (I) analizar la progresión meiótica durante la maduración *in vitro* de ovocitos procedentes de cabras prepúberes y, (II) evaluar el efecto de la tinción Hoechst 33342 y su posterior exposición a luz UV sobre la progresión meiótica de ovocitos de cabras prepúberes.

MATERIAL Y METODOS

Obtención y cultivo de ovocitos

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes procedentes de un matadero comercial y se transportaron al laboratorio mediante un recipiente isotérmico. Tras lavar tres veces los ovarios con PBS suplementado con gentamicina, se procedió a aspirar los folículos de un diámetro comprendido entre 2-3mm mediante una aguja hipodérmica de 19G. La aspiración se realizó con medio TCM199 (SIGMA) suplementado con 4µl/ml de gentamicina

Se seleccionaron los ovocitos que presentaron citoplasma homogéneo y como mínimo una capa de células del cúmulus, y se transfirieron en grupos de 50 a las gotas de maduración. El medio de maduración utilizado consistió en medio TCM 199 suplementado con 100µl/ml de FBS (Suero fetal bovino, SIGMA), 10µg/ml LH (Administrada por J.F Beckers, IRSIA Research Unit, University of Liege, Belgium), 10µg/ml o-FSH (Ovagen, Immuno Chemicals Products, LTD, Auckland, New Zealand) y 1µg/ml 17β estradiol (SIGMA). La maduración se llevó a cabo en 500µl de medio a 38.5°C en una atmósfera del 5% de CO_2 en aire y saturada de humedad.

Experiencia 1: Análisis de la progresión meiótica durante la MIV.

Tinción y observación de ovocitos

Se tomó una muestra de ovocitos a las 0h, 8h, 15h, 20h y 27h de maduración *in vitro* (MIV), los cuales fueron expuestos a una solución de 0,5µg/ml de colorante Hoechst 33342 en PBS durante tres minutos. Una vez teñidos, se lavaron tres veces con PBS (GIBCO) suplementado con glucosa, piruvato, 0,5% de BSA (Fraction V, SIGMA) y 10mg/ml de gentamicina (PBSm)

Los ovocitos fueron distribuidos en gotas individuales de PBSm para su posterior observación en el microscopio de fluorescencia BX50, equipado con una lampara de mercurio de 100W. La fluorescencia se observó tras excitación a 360nm a través del filtro comercial Olympus NU. Los ovocitos fueron clasificados en 6 categorias en función del estadio nuclear que presentaron: VG (Vesícula germinativa), VGBD (ruptura de la vesícula germinativa), MI (Metafase I), A/T (Anafase o Telofase), MII (Metafase II) y ND (ovocitos no identificados).

Fijación de ovocitos y valoración con tinción Lacmoide

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad de la tinción Hoechst, y tras su visualización en el microscopio de fluorescencia, los ovocitos se fijaron en una solución de ácido acético 90%-etanol (1:3, v/v) a 4°C durante 24h. Posteriormente, se tiñeron con solución de Lacmoide al 1% en una solución de ácido acético al 45% y se observaron en un microscopio de contraste de fases. Los ovocitos fueron clasificados en las categorías descritas anteriormente en función del estadio nuclear que presentaron.

Experiencia 2: Efecto de la tinción Hoechst 33342 sobre la progresión meiótica.

Tinción y observación de ovocitos

Se tomaron dos muestras de ovocitos a las 0h, 8h, 15h y 20h de maduración *in vitro* (MIV). Las dos muestras se sometieron a una solución de hialuronidasa 1mg/ml con la finalidad de eliminar las células del cúmulus. Una vez separadas, los ovocitos de la primera muestra se devolvieron a las gotas de maduración y fueron clasificados como grupo CUM-. Los ovocitos de la segunda muestra fueron expuestos a 0,5µg/ml de colorante Hoechst 33342 durante tres minutos, se lavaron tres veces con PBSm y se expusieron durante tres segundos a UV. Posteriormente los ovocitos se devolvieron a las gotas de MIV y fueron clasificados como grupo Hoechst. El grupo control de maduración constó de ovocitos puestos a madurar inmediatamente tras su obtención y mantenidos durante 27h a 38,5°C y 5% de CO_2 saturado de humedad.

Valoración de la viabilidad ovocitaria

Tras 27h de maduración *in vitro* los ovocitos fueron fijados y analizados mediante la solución de lacmoide.

Análisis estadístico: Todos los datos fueron analizados mediante test de χ^2, considerándose significativas las diferencias a partir de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en la experiencia 1 se hallan expuestos en la Tabla I y representados gráficamente en la Figs.1 y 2. En dicha tabla se observa un predominio significativo ($p<0,05$) de ovocitos en estadio de VG yVGBD a las 0h de MIV, de ovocitos en estadio de MI a las 8h, de ovocitos tanto en estadio de MI como de MII a las 15h y de ovocitos en los estadios de Anafase y MII a las 20h de MIV. A las 27h de MIV se observa un predominio significativo de ovocitos en estadio de MII. A diferencia de los patrones de maduración nuclear existentes en la bibliografía para ovocitos de cabras adultas (Sharma *et al.*, 1996; Gall *et al.*, 1996) podemos observar un elevado porcentage de ovocitos en estadio de VGBD a las 0h. Es conocido que los folículos presentan una serie de factores inhibidores de la maduración nuclear, los cuales en su defecto inducirían la activación del ovocito tras su separación del ambiente folicular. En base a nuestros resultados, dicha activación tendría lugar mas rápidamente en los ovocitos de cabras prepúberes en comparación con los de adultas y como consecuencia, todo el proceso de maduración nuclear parece tener lugar de forma mas acelerada.

Tabla I- Estadio nuclear a diferentes horas de MIV tras la tinción con Hoechst 33342

	Estadio nuclear						
Hores MIV	n	VG	VGBD	MI	A/T	MII	ND
0	62	17*	24*	10	1	2	8
8	76	7	16	36*	2	0	11
15	74	1	1	23*	7	19*	23
20	84	5	0	8	24*	31*	12
27	100	2	2	13	9	51*	20

MIV: Maduración *in vitro*; VG: Vesícula Germinal; VGBD: Ruptura de la vesícula germinal; MI: Metafase I; A/T: Anafase o telofase; MII: Metafase II; ND: no identificados.

*, estadio que predomina significativamente del resto para un intervalo de tiempo concreto (χ^2, $p<0.05$)

De forma global, al evaluar las coincidencias existentes entre las tinciones de Hoechst y Lacmoide, no se observaron diferencias significativas en la distribución de los ovocitos en función de su estado de maduración nuclear. Sin embargo, para el intervalo de 8h de MIV, las distribuciones para ambas tinciones fueron diferentes significativamente ($p<0,01$; Figs. 1 y 2).

Estas diferencias podrían ser debidas a que varias de las metafases I identificadas mediante la tinción de Hoechst fueron posteriormente clasificadas como metafase II con la tinción de lacmoide. El corto periodo de observación utilizado en la tinción de Hoechst, necesario para mantener la viabilidad de los ovocitos, no permitiría en ocasiones diferenciar correctamente ambos estadios.

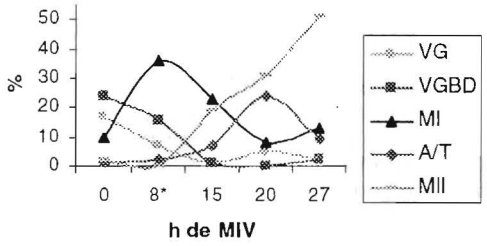


Fig 1- Progresión nuclear durante la MIV mediante la tinción de Hoechst
* La distribución de ovocitos en función de su estadio nuclear difiere significativamente entre ambas tinciones (p<0,01)

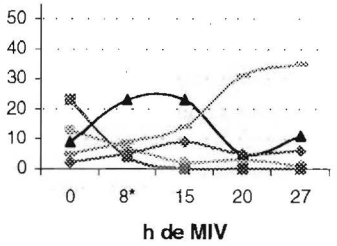


Fig 2- Progresión nuclear durante la MIV mediante la tinción de lacmoide

Los resultados obtenidos en la experiencia 2 se hallan expuestos en la Tabla II. La no existencia de diferencias significativas entre el grupo control y el grupo CUM- en ninguna de las horas de maduración analizadas (p<0,05), indicaría que la presencia de las células del cúmulus no sería un factor indispensable para la progresión meiótica. Existieron diferencias significativas entre el grupo Hoechst y el grupo control a las 0, 8 y 15h (p<0,05), evidenciandose el efecto tóxico del Hoechst sobre el DNA. El hecho de no observar diferencias significativas a las 20h de MIV podría ser debido a que la mayoría de los ovocitos ya habían alcanzado el estadio de metafase II y por tanto la maduración nuclear.

Tabla II- Ovocitos en estadio de Metafase II a las 27h de MIV tras tinción con Hoechst y exposición al UV

		0H		8h		15h		20h	
	CONTROL	CUM-	Hoechst	CUM-	Hoechst	CUM-	Hoechst	CUM-	Hoechst
n	136	39	99	52	97	38	105	55	87
MII	128**a**	37**a**	36**c**	46**ab**	72**b**	32**ab**	51**c**	51**a**	75**ab**
(%)	(94,1)	(94,8)	(36,6)	(88,4)	(74,2)	(84,2)	(48,5)	(92,7)	(86,2)

CUM+: Ovocitos con células del cúmulus; CUM-: Ovocitos sin células de cúmulus; H:Ovocitos tratados con Hoechst33342
a,b,c- superíndices diferentes indican diferiencias significativas entre columnas (χ^2, p<0.05)

En resumen, la tinción Hoechst 33342 y la posterior exposición a luz UV provocan una reducción significativa de la viabilidad ovocitaria cuando se aplica en periodos intermedios del proceso de maduración *in vitro* en ovocitos de cabras prepúberes.

BIBLIOGRAFIA

Flaherty, SP., Payne, D., Swann, NJ., Matthews, CD. (1995) Reprod. Fertil. Dev. 7: 197-210.
Debey, P., Szöllösi, MS., Szöllösi, D., *et al.* (1993) Mol. Reprod. Dev. 36: 59-74.
Gall, L., De Smedt, N., Crozet, Ruffini, S. and Sevellec, C. (1996) Theriogenology 46: 825-835.
Green, DPL. (1992) J. Reprod. Fert. 96: 581-591.
Hinkley, RE., Wright, BD., Lynn, JW. (1986) Dev. Biol. 118, 148-154.
Sawicki, W., Mystkowska, ET. (1990) Anat. Rec. 227: 359-362.
Sharma, GT., Majumdar, AC. and Bonde SW. (1996) Small Rum. Res. 22 :25-30.
Stricker, SA. (1995) Dev. Biol. 170: 496-518.
Stricker, SA. and Schatten, G. (1989) Dev. Biol. 135, 87-88.
Whesthusin, ME., Levanduski, MJ.,Scarborough *et al.*(1990) Biol. Reprod. 42: 176.
Zuccotti, M., Piccinelli, A., Rossi, PG., Garagna, S. (1995) Mol. Reprod. Dev. 41: 479-485.