SELECCION DE OVOCITOS DE CABRAS PREPUBERES MEDIANTE LA TINCION VITAL *BRILLIANT CRESYL BLUE*

Rodríguez-González, E.; López-Béjar, M.; Velilla, E.; Oter, M.; Paramio, M.T.
Dpto. De Patología y Producción Animales, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona

INTRODUCCION

Ovocitos procedentes de animales prepúberes pueden ser madurados, fecundados *in vitro* y, tras cultivo embrionario y transferencia, pueden producir descendencia viable en varias especies (Armstrong et al., 1992; Lazzari et al., 1996; Ledda et al., 1997). Sin embargo, diversos estudios han destacado que la capacidad de desarrollo de los embriones derivados de estos ovocitos es inferior a la de embriones obtenidos de animales adultos, indicando una posible maduración incompleta del ovocito (Revel et al, 1995; Earl et al., 1998).

La selección de aquellos ovocitos que hayan completado su fase de crecimiento intraovárico permitiría estudiar de forma adecuada las necesidades específicas para la maduración de los ovocitos procedentes de animales prepúberes. El test de *Brilliant Cresyl Blue* (BCB) ha sido utilizado para seleccionar ovocitos que aparentemente han completado su crecimiento en la especie porcina (Ericsson et al., 1993; Roca et al., 1995). El BCB permite determinar la actividad intracelular de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), un enzima únicamente presente en la fase de crecimiento del ovocito. Este compuesto azulado se reduce a uno incoloro ante la actividad de la G6PD (Ericsson et al., 1993). El objetivo de este estudio ha sido evaluar la utilidad del test de BCB para la selección de ovocitos de cabras prepúberes, analizando la competencia meiótica y la capacidad de desarrollo de los ovocitos seleccionados.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de los ovocitos

Los ovocitos utilizados en este estudio fueron obtenidos de ovarios de cabras prepúberes (aprox. 2 meses de edad) en un matadero comercial. La técnica de obtención de los ovocitos fue la de *slicing*. Los ovocitos seleccionados se distribuyeron en 5 grupos de tratamiento en función de la concentración de BCB analizada: 13, 19.5, 26, 39 y 52 μmol/L. El medio de dilución utilizado fue PBS modificado por la adición de BSA (4%), piruvato sódico, glucosa y gentamicina (PBSm). Los ovocitos se incubaron durante 90 min a 38.5ºC Tras la incubación, se clasificaron en dos grupos según la coloración del citoplasma:

- Ovocitos Teñidos (si presentaron el citoplasma teñido de azul)
- Ovocitos No Teñidos (si no presentaron el citoplasma teñido de azul).

Maduración in vitro (MIV)

La maduración de los ovocitos se realizó en medio M199 suplementado con 20% suero DBS (Donor Bovine Serum), 1 μg/ml 17β-estradiol, 10 μg/ml o-FSH y 10 μg/ml LH. Los ovocitos se incubaron durante 27h a 38.5ºC en una atmósfera del 5% de CO_2 en aire. Paralelamente, se realizó un control de MIV con ovocitos no expuestos al test de BCB, y otro control con ovocitos expuestos a PBSm durante 90 min. Al final del cultivo, los ovocitos se tiñeron con lacmoide al 1% y se clasificaron en 5 categorías en función del estadio nuclear que presentaron: Vesícula germinativa, Ruptura de la vesícula germinativa, Metafase I, Anafase-Telofase I y Metafase II.

En la segunda serie de experiencias, el efecto del test BCB sobre la fecundación y cultivo in vitro embrionario se evaluó con una concentración de 26 μmol/L, en base a los resultados obtenidos en la primera experiencia de MIV.

Fecundación in vitro (FIV)

Los ovocitos se inseminaron en medio TALP con una concentración final de $3.75*10^6$ espermatozoides/ml, siguiendo el protocolo descrito por Izquierdo et al. (1997). Paralelamente, se realizó un control de FIV empleando ovocitos no expuestos al test de BCB y otro control empleando ovocitos expuestos a PBSm durante 90 min.

A las 17 h post-inseminación (h.p.i.) se evaluaron los resultados de FIV mediante tinción con lacmoide. Los ovocitos fecundados se clasificaron en: 2PN+C (normal: pronúcleo femenino, pronúcleo masculino y cola del espematozoide), AN (anormal: una sola cola, pero con marcada alteración o retraso en la formación de los pronúcleos) y PS (poliespérmico)

Cultivo embrionario in vitro (CIV)

El CIV se realizó a las 24 h.p.i. en microgotas de 50 µl de medio SOF (Takahashi y First, 1992). Se colocaron 20-25 cigotos/gota y se dejaron incubar a 38.5ºC en una atmósfera del 90% de N_2, 5% CO_2 y 5% O_2. A las 48 h.p.i. se añadió un 10% de suero DBS y se evaluó la tasa de división embrionaria. El cultivo se mantuvo hasta el día 8 post-inseminación, analizándose el desarrollo embrionario alcanzado mediante la tinción nuclear Hoechst.

Análisis estadístico

Todos los resultados se compararon mediante un test χ^2, considerándose significativas las diferencias a partir de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mayor porcentaje de ovocitos teñidos se consiguió con la concentración de 26 µmol BCB/L PBSm (Tabla 1). En ovocitos porcinos, la concentración empleada para el test de BCB es de 13 µmol BCB/L PBSm (Ericsson et al.,1993; Roca et al., 1995).

El bajo porcentaje de ovocitos teñidos nos hace deducir que en ovarios de cabras prepúberes solamente una baja proporción de ovocitos ha completado su crecimiento. Se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de ovocitos teñidos y no teñidos que alcanzaron el estadio de metafase II, siendo en cada caso superior en el grupo de los teñidos (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de ovocitos en MII entre concentraciones.

Tabla 1: Influencia de la concentración de BCB sobre el porcentaje de ovocitos teñidos (réplicas=5)

Tratamiento	N	Ovocitos Teñidos n (%)
13	236	2 (0.8)^{d}
19.5	201	10 (5.0)^{c}
26	195	69 (35.4)^{a}
39	230	51 (22.2)^{b}
52	223	56 (25.1)^{b}

Tabla 2 : Influencia de la concenración de BCB sobre el porcentaje de ovocitos madurados nuclearmente (réplicas=5)

Tratamiento	% MII		SE	*P*
	Teñidos	No teñidos		
PBSm	-	62.77	6.399	-
13	100.0	48.76	18.366	0.0635
19.5	90.48	52.56	7.049	0.0097
26	84.12	51.20	7.969	0.0266
39	77.30	51.58	7.558	0.0427
52	76.60	45.03	4.250	0.0009
SE	15.965	6.399		
P	0.5668	0.4015		

Leyenda de las Tablas 1 y 2: Tratamiento: Concentración de BCB (µmol BCB/L en PBSm), **PBSm**: Control de ovocitos madurados y fecundados tras mantenimiento en PBSm durante 90 min, **Ovocitos Teñidos**: ovocitos teñidos de azul, **Ovocitos No Teñidos**: ovocitos que reducen el BCB a un componente incoloro, **%MII**: % de ovocitos en metafase II.

^{a,b,c,d}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2,$P<0.05$)

En la tabla 3 se muestran los resultados relativos a las 27 h de MIV, independientemente de la concentración de BCB empleada. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de maduración nuclear (MII) de los ovocitos teñidos (80.5%) respecto a los no teñidos (52.3%) y el control PBSm (64.0%). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo de teñidos (80.5%) y el control (76.2%).

El grupo de ovocitos teñidos presentó un porcentaje de fecundación normal (24.6%) significativamente superior al resto de grupos evaluados (Tabla 4). Sin embargo, pese a que con la tinción vital BCB podemos seleccionar los ovocitos que han finalizado su crecimiento, que presentan elevados porcentajes de maduración nuclear y mayor porcentaje de fecundación normal, la maduración citoplasmática no se realiza correctamente en nuestro sistema. En el presente estudio observamos una elevada

poliespermia. Una posible explicación podría encontrarse en los hallazgos de Damiani et al. (1996), quienes observaron que la mayoría de ovocitos de terneras prepúberes tras la maduración mostraban algún retraso en la migración de los orgánulos. Estos hallazgos explicarían la fecundación poliespérmica observada en estudios de FIV con ovocitos de terneras y ovejas prepúberes (Duby et al., 1996; Ledda et al., 1997; O'Brien et al., 1997; Gandolfi et al. 1998).

A las 48 h post-inseminación, la división embrionaria fue significativamente superior en los ovocitos teñidos (45.4%) que en los no teñidos (32.2%). Sin embargo, el porcentaje de embriones divididos que superó el estadio de 8 células y que alcanzó el estadio de mórula y blastocisto fue similar en los 2 grupos (Tabla 5).

Tabla 3: Estadio nuclear de los ovocitos expuestos a BCB tras 27 h de cultivo (réplicas=5)

Tratamiento		N	VG n (%)	GVBD n (%)	MI n (%)	An-Tel I n (%)	MII n (%)
Control		193	4 (2.1)	1 (0.5)^{b}	41 (21.2)^{b}	0 (0.0)	147 (76.2)^{a}
PBSm		172	1 (0.6)	3 (1.7)^{b}	57 (33.1)^{a}	1 (0.6)	110 (64.0)^{b}
BCB	Teñidos	174	0 (0.0)	0 (0.0)^{b}	33 (18.9)^{b}	1 (0.6)	140 (80.5)^{a}
	No Teñidos	724	8 (1.1)	45 (6.2)^{a}	290 (40.1)^{a}	2 (0.3)	379 (52.3)^{c}

PBSm: Control de ovocitos madurados tras mantenimiento en PBSm durante 90 min, **Teñidos**: ovocitos con citoplasma teñido de azul, **No Teñidos**: ovocitos que reducen el BCB a un componente incoloro;, **VG**: Vesícula germinativa, **GVBD**: Germinal vesicle breakdown o ruptura de la vesícula germinativa-prometafase I, **MI**: Metafase I, **An-Tel I**: Anafase-Telofase I, **MII**: Metafase II

^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2, $P<0.05$)

Tabla 4: Fecundación *in vitro* de los ovocitos expuestos a BCB a las 17 h post-inseminación (réplicas=5)

Tratamiento		N	FEC n (%)	2PN+C n (%)	PS n (%)	AN n (%)
Control		127	113 (89.0)^{ab}	15 (11.8)^{b}	72 (56.7)	26 (20.5)
PBSm		102	85 (83.3)^{b}	10 (9.8)^{b}	62 (60.8)	13 (12.7)
BCB	Teñidos	77	74 (96.1)^{a}	19 (24.6)^{a}	47 (61.0)	8 (10.4)
	No Teñidos	192	167 (86.9)^{b}	12 (6.3)^{b}	122 (63.5)	33 (17.2)

Tabla 5. Desarrollo *in vitro* de los ovocitos expuestos a BCB tras MIV y FIV (réplicas=5)

Tratamiento		N	48 h postI ≥ 2 céls. n (%)	8 d postI ≥ 8 céls. n (%)	8 d postI Mor+Blast n (%)
Control		178	84 (47.2)^{a}	11 (13.1)	2 (2.4)
BCB	Teñidos	227	103 (45.4)^{a}	11 (10.7)	3 (2.9)
	No Teñidos	877	282 (32.2)^{b}	32 (11.3)	3 (1.1)

Leyenda de las Tablas 4 y 5: PBSm: Control de ovocitos madurados y fecundados tras mantenerlos en PBSm durante 90 min, **BCB**: ovocitos expuestos al test de BCB con 26μM BCB/L PBSm , **Teñidos**: ovocitos teñidos de azul, **No Teñidos**: ovocitos que reducen el BCB a un componente incoloro, **FEC**: ovocitos fecundados, **2PN+C**: 2 pronúcleos + 1 cola de espermatozoide, **PS**: ovocitos poliespérmicos, **AN**: ovocitos fecundados anormalmente. , **≥8**: número de embriones con 8 ó más células (% calculado a partir de los embriones divididos), **Mor+Blast**: número de mórulas y blastocistos (% calculado a partir de los embriones divididos)

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2,$P<0.05$)

En resumen, podemos pensar que las anomalías en la fecundación y la baja formación de blastocistos observadas en el presente estudio se deban casi con seguridad a que se trata de ovocitos de cabras prepúberes, por lo que próximos estudios deberían estar dirigidos a la adecuación del medio de maduración a las características propias de este tipo de ovocitos. Como conclusión al presente estudio, deducimos que la técnica de BCB es un método eficaz de selección de ovocitos que han completado su crecimiento, evaluado por un mayor porcentaje de maduración nuclear y de fecundación normal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Armstrong et al (1992) Therio 38:667-678
Damiani et al (1996) Mol Reprod Dev 45:521-534
Duby et al (1996) Therio 45:121-131
Earl et al (1998) En: Lauria et al (eds) Serono Symp, Roma. pp. 115-137
Ericsson et al (1993) Therio 39:214
Gandolfi et al (1998) Mol Reprod Dev 49:168-175
Izquierdo et al (1997) ITEA Vol Extra n18:538-540
Lazzari et al (1996) J Reprod Fert Abstract n. 41
Ledda et al (1997) J Reprod Fert 109:73-78
O'Brien et al (1997) Therio 47:1433-1443
Revel et al (1995) J Reprod Fert 103:115-120
Roca et al (1995) J Reprod Fert Abstract n. 198
Takahashi y First (1992) Therio 37:963-978