ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 264-266

EFECTO DEL TEST DE BCB Y MADURACIÓN EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CISTEAMINA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS DE CABRAS PREPUBERES

Urdaneta,A.E., Jiménez-Macedo, A.R., Izquierdo M.D., Paramio M.T
Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici V, 08193 Bellaterra. Barcelona

INTRODUCCIÓN

La obtención de un reducido número de blastocistos a partir de ovocitos de cabras prepúberes se debe probablemente a una maduración citoplasmática incorrecta.
Se ha demostrado en la especie caprina que la competencia del ovocito para desarrollarse hasta el estado de blastocisto está determinada por la finalización de la fase de crecimiento dentro del folículo (Crozet y col.,1995). Estudios previos en nuestro laboratorio con ovocitos de cabra prepúber demuestran que se pueden seleccionar ovocitos más competentes utilizando el test de Azul de Cresol Brillante (BCB) (Rodríguez-González y col., 2002). Este test es un método colorimétrico que permite determinar la actividad intracelular de enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), presente únicamente en la fase de crecimiento del ovocito (Ericsson y col., 1993).
Por otro lado, se ha demostrado que la inclusión de cisteamina en el MIV, estimula la síntesis de glutatión intracelular en los ovocitos (vaca: De Matos y col., 1995, 1996, 1997; oveja: De Matos y col., 1999; cerdo: Yamuchi y Nagai, 1999), incrementa la proporción de ovocitos capaces de formar el pronúcleo masculino después de la FIV (cerdo: Grupen y col., 1995; hámster: Kito y Bavister, 1997; cabra prepúber: Rodríguez-González y col., 2001) y estimula el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (vaca: De Matos y col., 1995, 1996; cerdo: Grupen y col., 1995; Yamuchi y Nagai, 1999).
Este estudio se ha realizado con el objetivo de analizar si la selección de ovocitos mediante el test de BCB y la presencia de cisteamina en concentraciones mayores a 100μM, permiten mejorar la maduración citoplasmática y por ende incrementar la producción de blastocistos in vivo a partir de ovocitos de cabras prepúberes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de los ovocitos : Los ovocitos se obtuvieron mediante slicing después de recoger ovarios de cabras de aproximadamente 2 meses de edad de un matadero comercial.

Test de BCB : Los ovocitos obtenidos se expusieron a 26 μmol/L de BCB (Sigma, B-5388) diluido en mPBS durante 90 minutos a 38.5ºC. Tras la exposición a BCB, los ovocitos se clasificaron en 2 grupos según la coloración de su citoplasma: BCB+ (ovocitos que presentaron una coloración azul del citoplasma) y BCB- (ovocitos que no presentaron esta coloración). Tras la clasificación, se pusieron a cultivar.

Maduración in vitro (MIV) de los ovocitos: La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 100 μl de medio TCM199 suplementado con 275 μg/ml piruvato sódico, 146 μg/ml L-glutamina, 50 μg/ml gentamicina, 10% (v/v) suero SS, 10 μg/ml LH, 10 μg/ml o-FSH, 1 μg/ml 17β-estradiol y 100 μM cisteamina o 200μM cisteamina o 400μM cisteamina. Los ovocitos se cultivaron durante 25hy 30m a 38.5ºC en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire y saturada de humedad. Paralelamente, se realizó un control de ovocitos no expuesto al test de BCB y madurado en el citado medio de

MIV, pero libre de cisteamina. Al final del cultivo, se tiño una muestra de los ovocitos con lacmoide al 1% y se evaluó el estadio nuclear.

Fecundación in vitro (FIV) de los ovocitos: Tras 25 horas y 30 minutos de maduración, los ovocitos se lavaron en medio de fecundación. La FIV se realizó en micro gotas de 100 μL de medio de fecundación TALP (modified Tyrode's medium definido por Parrish y col.,1986), suplementado con 1 μg/ml hipotaurina. Los ovocitos se inseminaron con una alícuota (5 μ) de la suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final de aproximadamente $3.5x10^6$ (spz/ml). El co-cultivo se mantuvo durante 24 h. Se tomó una muestra de los ovocitos a las 17 horas post-inseminación y se evaluó el estadio nuclear mediante lacmoide al 1%.

Cultivo embrionario in vitro (CIV): El cultivo in vitro (CIV) se realizó en micro gotas (1 μL medio de cultivo / embrión) de fluido oviductal sintético (SOF, Takahashi y First, 1992), a 38.5ºC en una atmósfera de 90% de N_2, 5% de CO_2 y 5% de O_2. Los presuntos embriones se mantuvieron en cultivo durante 7 días. A las 48 h post-inseminación se añadió a las micro gotas un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (0,1 μL suero / embrión). Tras los 7 días del inicio del cultivo se evaluó el desarrollo embrionario alcanzado mediante tinción de Hoechst 33342.

Análisis estadístico: Las diferencias entre grupos de tratamiento se calcularon mediante el test de χ^2. Se consideraron significativas las diferencias con un valor de probabilidad < 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos después de 25h y 30m de MIV y 17h post inseminación. En presencia de 200μM de Cisteamina los ovocitos BCB+ presentaron tasas superiores de maduración nuclear ($P< 0.05$) respecto a los ovocitos BCB-, a los ovocitos control madurados en un medio sin cisteamina y a los ovocitos BCB+ madurados con 100 y 400μM de cisteamina, sin embargo durante la FIV no se observaron diferencias significativas en la formación de los 2 pronúcleos al comparar los ovocitos BCB+ madurados con las concentraciones de cisteamina estudiadas, ni con los ovocitos del grupo control. Entre los ovocitos BCB+ y BCB- madurados con 100 y 200μM de cisteamina, se observaron diferencias significativas ($P<0.05$), mientras que los madurados con 400μM no presentaron diferencias independientemente de la clasificación de BCB+ o BCB-. Los ovocitos BCB+ mostraron tasas menores de poliespermia que los ovocitos BCB- en todas las concentraciones estudiadas.

En la Tabla 2 se presentan los valores relacionados con el desarrollo embrionario in vitro a los 8 días post inseminación. Los ovocitos BCB+ madurados con 100μM y 200μM de cisteamina mostraron mayores tasas de embriones totales ($P<0.05$)que los ovocitos BCB-, sin embargo no se encontraron diferencias entre los BCB+ y BCB- madurados con 400μM. Los ovocitos BCB+ madurados en presencia de 400μM de cisteamina presentaron un mayor número de embriones que superaron el estadío de 8-16 células.

En conclusión, seleccionar ovocitos de cabras prepúberes utilizando el test de BCB y posteriormente madurarlos en un medio suplementado con cisteamina, es un sistema útil para la obtención de ovocitos con mayor capacidad de desarrollo. Asimismo la suplementación con 400 μM de cisteamina en el medio de MIV, aparentemente mejora la capacidad de desarrollo de los ovocitos menos competentes clasificados como BCB-.

Tabla 1. Efecto del test de BCB y adición de diferentes concentraciones de cisteamina en el medio de MIV sobre la maduración nuclear y la FIV de ovocitos de cabras prepúberes (9 réplicas).

	MIV		FIV				
Tratamiento	Número total de ovocitos	MII n (%)	Número total de ovocitos	Fecundación n (%)	2 Pronúcleos n (%)	Asincronía n (%)	Poliespermia n (%)
100µM Cistea							
BCB+	131	89 (67.93)^{ae}	101	37 (36.63)	32 (86.48)^{a}	2 (5.40)	3 (8.10)^{a}
BCB-	128	74 (57.81)^{bd}	101	34 (33.66)	20 (58.82)^{b}	6 (17.64)	8 (23.52)^{b}
200µMCistea							
BCB+	153	134 (87.58)^{c}	102	43 (42.15)	37 (86.04)^{a}	2 (4.65)	4 (9.30)^{ac}
BCB-	152	108 (71.05)^{a}	105	32 (30.47)	21 (65.62)^{b}	2 (6.25)	9 (28.12)^{c}
400µMCistea							
BCB+	144	111 (77.08)^{a}	100	33 (33.0)	26 (78.78)^{ab}	2 (6.06)	5 (15.15)
BCB-	153	94 (61.43)^{de}	104	35 (33.65)	25 (71.42)^{ab}	1 (2.85)	9 (25.71)
Control	178	133 (74.71)^{a}	165	56 (33.9)^{a}	48 (85.7)^{a}	3 (5.3)	5 (8.9)^{bd}

MII: Metafase II; Fecundación: una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado; ^{a,b,c} Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P<0.05$).

Tabla 2. Efecto del test de BCB y adición de diferentes concentraciones de cisteamina en el medio de MIV sobre el desarrollo embrionario in vitro de ovocitos de cabras prepúberes (9 réplicas).

Tratamiento	Número total de ovocitos insemin	Desarrollo embrionario a los 8 d post-inseminación			
		Embriones totales n (%)	Embriones 2-7 células n (%)*	Embriones 8-16 células n (%)*	Mórulas + Blastocistos n (%)*
100µM Cisteamina					
BCB+	203	74 (36.45)^{a}	56 (75.67)	15 (20.27)	3 (4.05)^{ab}
BCB-	195	35 (17.94)^{b}	30 (85.71)	3 (8.57)	2 (5.71)^{ac}
200µM Cisteamina					
BCB+	221	75 (33.93)^{a}	64 (85.33)	9 (12.0)	2 (2.66)^{ab}
BCB-	253	28 (11.06)^{b}	25 (89.28)	2 (7.14)	1 (3.57)^{bac}
400µM Cisteamina					
BCB+	204	73 (35.78)^{a}	51 (69.89)	12 (16.43)	10 (13.69)^{c}
BCB-	215	63 (29.30)^{a}	50 (79.36)	10 (15.87)	3 (4.76)^{bc}

*Porcentajes calculados respecto al total de embriones; ^{a,b,c} Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P<0.05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De Matos y col. (1995). Mol. Repr. Dev. 42: 432-436
De Matos y col. (1996). Mol. Repr. Dev. 45: 451-457
De Matos y col. (1997). Biol. Repr. 57: 1420-1425
De Matos y col. (1999). Therio. 51: 368 abstr
Ericsson y col. (1993). Therio. 39: 214 abstr
Grupen y col. (1995). Biol. Repr. 53: 173-178
Kito y Bavister (1997). J. Repr. Fert. 110: 35-46
Rodríguez-González y col. (2001). Therio. 55: 493
Rodríguez-González y col.(2002).Therio.57: 1373-1409
Takahashi y First.(1992). Therio.37:963-978
Yamuchi Y Nagai (1999). Biol. Repr. 61:828-833