ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 270-272

EFECTO DEL PRECULTIVO CON ROSCOVITINA, UN INHIBIDOR DEL MPF, SOBRE LOS RESULTADOS DE FECUNDACIÓN Y DESARROLLO IN VITRO DE OVOCITOS PORCINOS

R Romar, C Matas, E García, S Cánovas, J Gadea, P Coy.
Departamento Fisiología. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Murcia. e-mail: pcoy@um.es, www.um.es/grupo-fisiovet

INTRODUCCIÓN

In vivo, los ovocitos meioticamente competentes son mantenidos en el estadio de vesícula germinal (GV) por el ambiente folicular hasta el momento en que tiene lugar el pico preovulatorio de gonadotropinas. Esto les permite continuar con el proceso de diferenciación hasta la ovulación. In vitro, el mantenimiento del arresto meiótico en ovocitos extraídos de su ambiente folicular puede conseguirse mediante la adición al medio de cultivo de diversos inhibidores, como la roscovitina o la butirolactona I (Lonergan et al., 2003). Ambos son inhibidores específicos de las quinasas dependientes de ciclina, y por tanto del factor promotor de la maduración (MPF). Se especula con la posibilidad de que el precultivo en presencia de un inhibidor antes de la maduración in vitro (MIV) permita obtener ovocitos con una mayor capacidad de desarrollo embrionario. El objetivo del presente trabajo fue comprobar el efecto del precultivo de ovocitos porcinos en un medio con roscovitina durante 24 horas antes de la MIV sobre los resultados de la fecundación y el desarrollo hasta el estadio de blastocisto in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios de hembras porcinas prepúberes sacrificadas en matadero fueron trasladados a los laboratorios de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Murcia. Los complejos cumulus-ovocito (COCs) de folículos aparentemente no atrésicos fueron cultivados durante 24 horas en presencia de 50 μM de roscovitina en medio NCSU-37 suplementado con 0'57 mM de cisteína, 5μg/ml de insulina, 50 μM de ß-mercaptoetanol y 10% de fluido folicular porcino. Tras este tiempo, fueron sometidos a un sistema de MIV porcina convencional (Coy et al., 2002) durante 44 horas adicionales. Grupos de COCs no precultivados con roscovitina fueron madurados bajo las mismas condiciones para ser utilizados como control.

El proceso de capacitación fue inducido previamente mediante la deposición de 0'5 ml de semen diluído (1:1 en BTS) sobre una columna de percoll 45/90, y centrifugación a 400g durante 30 minutos. El pellet resultante se resuspendió en medio TBM y se centrifugó a 150g durante 10 minutos. Concluido el periodo de maduración, los ovocitos fueron introducidos en microgotas de cultivo conteniendo 50 μl de medio TBM modificado (Berger y Horton, 1988), sobre las que se añadieron 50 μl de este mismo medio con los espermatozoides a una concentración final de $0'5x10^6$ esp/ml.

Transcurridas 18 horas después de la FIV se separaron la mitad de los posibles cigotos para su evaluación (mediante fijación y posterior tinción con orceina), y el resto se trasladaron a medio NCSU-23 suplementado con 0'4 gr/100 ml de BSA y 10ml/L de MEM de y 20 ml/L de BME. A las 48 horas post-FIV se evaluó el porcentaje de embriones divididos (2-4 células) mediante análisis morfológico bajo estereomicroscopio, y a los 8 días el porcentaje de blastocistos, los cuales fueron fijados y teñidos con Hoechst 33422 para determinar el número de células.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En experimentos previos en nuestro laboratorio (Coy et al., 2003) observamos que el precultivo de los ovocitos en medio NCSU-37 con 50 μM de roscovitina durante 24 horas mantenía el estadio de GV en el 100% de los ovocitos, y que el 82% de éstos alcanzaban el estadio de Metafase II tras someterlos posteriormente a un sistema de MIV convencional.

Los resultados obtenidos en la fecundación in vitro (Tabla 1) muestran valores similares entre el grupo experimental y el control para los parámetros de penetración, % MPN (pronúcleo masculino) y % MONO (monospremia). Sin embargo, se observa un número significativamente mayor de espermatozoides por ovocito en los ovocitos tratados con la roscovitina (2.54 vs. 3.25, $p=0.0005$). Los ovocitos preincubados con roscovitina tienden ($p=0.0725$) a presentar un menor porcentaje de embriones en estadio de 2 pronúcleos (28.80 vs. 20.14). Esta tendencia se confirma después en el cultivo embrionario (Tabla 2) con una mejor tasa de división para el control que para roscovitina (24.66 vs. 17.81, $p=0.0295$). Sin embargo las tasas de formación de blastocistos no difieren significativamente entre los grupos consideradas en valores absolutos o relativos a las tasas de división, mostrando los de la roscovitina una tendencia (26.47 vs. 34.69, $p=0.0724$) a tener una mayor calidad embrionaria con un mayor número de células a los 8 días de cultivo.

El MPF es una serín treonín quinasa formada por una subunidad catalítica, $p34^{cdc2}$, y una subunidad reguladora, ciclina B (Gautier et al., 1988). Durante la fase de crecimiento del ovocito, las dos subunidades forman el pre-MPF inactivo fosforilado a nivel de los residuos Thr 161, Thr 14 y Tyr 15 de la $p34^{cdc2}$. Cuando se reanuda la maduración nuclear, el dímero se activa por la defosforilación específica del residuo Tyr 15 catalizada por la fosfatasa cdc25 (Norbury y Nurse, 1992). La reanudación de la meiosis da lugar a un bloqueo repentino de la transcripción y provoca profundas modificaciones en el patrón de neosíntesis proteica (Wu et al., 1996; Lonergan et al., 1997 en Mermillod et al., 2000). La roscovitina inhibe la activación de la $p34^{cdc2}$ compitiendo con el ATP por la unión al receptor, es decir, nos permite prolongar el tiempo durante el cual el ovocito continúa con su actividad transcripcional y de síntesis proteica in vitro porque no reanuda la meiosis. El desarrollo de sistemas de maduración in vitro que permitan mantener durante más tiempo a los ovocitos en estadio de GV abre un interesante campo de investigación para conocer con mayor precisión diferentes aspectos de la maduración citoplasmática. Parece indudable que la actividad del ovocito durante la fase folicular es fundamental para su capacidad

posterior de desarrollo embrionario. En consecuencia, una vez que quede claramente demostrado que la utilización de moléculas como la roscovitina no interfiere con los resultados de FIV, desarrollo temprano y desarrollo a término de los embriones producidos in vitro, el estudio de los factores claves en la maduración citoplásmatica del ovocito que afectan al desarrollo embrionario in vitro puede ser una realidad

Tabla 1. Resultados de FIV de ovocitos precultivados en roscovitina: tasa de penetración (% PEN), número medio de espermatozoides por ovocito (S/O), formación de pronúcleo masculino (% MPN), monospermia (% MONO) y porcentaaje de ovocitos en estado de dos pronúcleos (2PN). Se muestran los valores medios ± SEM resultantes de seis ensayos.

GRUPO	N	% PEN	S/O	% MPN*	% MONO*	% 2 PN*
CONTROL	321	57.32±2.76	2.54±0.11	90.22±2.20	34.24±3.51	28.80±3.35
ROSCOVITINA	276	52.17±3.01	3.25±0.18	90.28±2.48	27.78±3.75	20.14±3.35
P		0.2083	0.0005	0.9855	0.2120	0.0725

*Sobre los ovocitos penetrados

Tabla 2. Resultados del cultivo embrionario de ovocitos precultivados en roscovitina: porcentajes de división y formación de blastocistos, nº medio de células por blastocisto (N CEL/BLASTO).

GRUPO	N	% DIVISIÓN	% BLASTOCISTOS*	% BLASTOCISTOS **	N CEL/BLASTO
CONTROL	365	24.66±2.26	20.00±4.24	4.93±1.13	26.47±1.49
ROSCOVITINA	320	17.81±2.14	21.05±5.45	3.75±1.06	34.69±4.66
P		0.0295	0.8784	0.4516	0.0724

*Sobre los embriones divididos
** Sobre los ovocitos totales

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berger T, Horton MB. Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility *Gamete Research* 19: 101-111. 1988.

Coy P, Cánovas S, García E, Ruiz S, Gadea J, Matás C, Romar R. Effect of roscovitine, a cyclin dependent kinases inhibitor, on pig in vitro maturation and fertilization by ICSI. 19th Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology. Madrid, 29 Junio-2 Julio 2003.

Coy P, Gadea J, Romar R, Matás M, García E. Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening, and *in vitro* development in pigs. *Reproduction*: 124:279-288. 2002

GautierJ, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle. *Cell* 54: 433-439. 1988.

Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M. Ultraestructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. *Mol Reprod Dev* 64:369-378. 2003.

Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J. Reprod. Fertil.* 109:355-365. 1997.

Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol. Reprod. Dev.* 55:89-95. 2000.

Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and thier control. *Annu Rev Biochem* 61:441-470. 1992.

Wu B, Ignotz GG, Currie WB, Yang X. Dynamics of maturation promoting factor (MPF) and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 54:207. 1996.