ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE P34^{cdc2} Y CICLINA B1 EN DIFERENTES TAMAÑOS DE OVOCITOS DE CABRAS PREPÚBERES

B. Anguita, AR. Jiménez-Macedo, D. Izquierdo, MT. Paramio
Dpto. Ciència Animal i dels aliments. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra (Barcelona)

INTRODUCCIÓN

En general la selección de ovocitos que van a ser utilizados en los programas de producción *in vitro* de embriones se realiza siguiendo criterios basados en su morfología y tamaño. Sin embargo, el porcentaje de blastocistos obtenidos hasta el momento en cabras prepúberes siguiendo estos criterios es bajo y variable, lo que nos hace sospechar que tal vez los criterios de selección utilizados no sean los más adecuados para seleccionar ovocitos competentes.

La utilización de ovarios obtenidos de hembras sacrificadas en matadero se caracteriza por una alta heterogeneidad en la calidad de los ovocitos, lo que repercute en los resultados obtenidos. Por lo tanto sería necesario establecer un criterio que nos permitiera homogeneizar la población ovocitaria, además de poder seleccionar sólo los ovocitos competentes para el desarrollo embrionario.

Se cree que la incompetencia ovocitaria puede ser debida a una incompleta maduración nuclear y/o citoplasmática. El principal regulador de la maduración nuclear es el *Maturation Promoting Factor* (MPF), y también se considera un posible regulador de la maduración citoplasmática (Naito y col, 1992). El MPF es un heterodímero con actividad serina-treonina kinasa, compuesto por una subunidad catalítica, la p34^{cdc2}, y una subunidad reguladora, la Ciclina B1 (Labbé y col, 1989). Para que el complejo MPF pueda activarse es necesario que las 2 subunidades se unan y se produzca la fosforilación de los residuos thr 161, thr 14 y tyr 15 de la p34^{cdc2}. El complejo sólo se activará cuando se dé la defosforilación de los residuos thr 14 y tyr 15 (Gautier y col, 1991). Esta activación dará lugar a la reanudación de la meiosis en el ovocito.

En numerosas especies se ha relacionado la falta de síntesis o actividad del MPF o algunas de sus subunidades con la incompetencia del ovocito. La síntesis de p34^{cdc2} se considera el factor limitante para la adquisición de competencia meiótica en ratón (Chesnel y Eppig, 1995) y cabras adultas (Dedieu y col, 1998), mientras que la ciclina B1 se hipotetiza como el responsable de la reanudación de la meiosis en vacas (Lévesque y Sirard, 1996) y cerdos (Sun y col, 2001).

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que la falta de competencia de los ovocitos de cabras prepúberes podría explicarse por una falta en la síntesis de alguno de los componentes del MPF, lo que nos podría servir de marcador molecular para seleccionar sólo los ovocitos competentes antes de la MIV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios de cabra prepúberes (45-60 días) se obtuvieron en un matadero comercial. Los complejos cumulus-ovocitos (COCs) fueron liberados de sus folículos mediante la técnica de *slicing*, y únicamente se seleccionaron aquellos con al menos

tres capas compactas e intactas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo. Una parte de los ovocitos obtenidos se utilizaron para realizar la MIV durante 27 horas en medio TCM199 suplementado con hormonas y cisteamina. El resto de los ovocitos, en el momento de la recolección, fueron denudados y clasificados en 4 grupos según su diámetro: < 110 µm, 110-125 µm, 125-135 µm,> 135 µm. Tras las 27 horas, los ovocitos madurados también fueron denudados y clasificados en los 4 grupos de tamaños anteriores. Una parte de los ovocitos medidos en el momento de la recolección y tras la MIV se utilizaron para determinar su estadío nuclear mediante tinción con lacmoide. El resto congelaron en nitrógeno líquido, y fueron almacenados a -80 ºC. Los ovocitos almacenados fueron utilizados para el estudio de la transcripción de la $p34^{cdc2}$ y ciclina B1 mediante la RT-PCR semi-cuantitativa. Para ello, primero se realizó la extracción del RNA de grupos de 10 ovocitos mediante *TriReagent*® (Sigma). Antes de iniciar el proceso, se añadió a cada muestra 10 pg de mRNA de globina de conejo, que nos sirvió como control de eficiencia de los procesos de extracción de RNA y RT-PCR. Después de la extracción, se trató la muestra con 1 U/µl de DNAsa (Invitrogen) a 37ºC durante 30 min para digerir el DNA genómico que pudiera haber quedado. La RT se realizó con el RNA correspondiente a 10 ovocitos utilizando el *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen). El cDNA correspondiente a 2 ovocitos fue amplificado por PCR, utilizando los siguientes *primers*:

- p34 cdc2 *Forward*: 5'-GAATTAGCAACGAAGAAACC
- P34 cdc2 *Reverse* : 5'- GTACAATTATCTGCTCTTGAC
- Ciclina B1 *Forward*: 5'- GAGCCATCCTCATTGACTGGC
- Ciclina B1 *Reverse*: 5'- CTTAGATGCTCTCCGAAGG

Cada banda de amplificación fue cuantificada mediante densitometría con el programa *Quantity One* (BioRad). Cada valor fue normalizado respecto al mRNA de globina de conejo, que fue utilizado como control extrínseco de todo el proceso.
Los resultados obtenidos de estadío nuclear en el momento de la recolección y tras la MIV en los diferentes grupos de tamaño se analizaron mediante el test de Fisher, mientras que los resultados de RT-PCR fueron analizados con el test de ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A 0 horas observamos que la mayoría de ovocitos ya han reanudado la meiosis, y se relaciona positivamente con el tamaño ovocitario. Esta prematura reanudación podría ser indicador de que provienen de folículos atrésicos, lo que según Zeuner y col (2003) no supone una disminución de la competencia para el desarrollo de estos ovocitos. Tras la MIV, la capacidad de los ovocitos para llegar hasta MII también está relacionada con su tamaño. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en cuanto al nivel de mRNA detectado de $p34^{cdc2}$ ni de ciclina B1, ni en el momento de la recolección ni tras la MIV. Por lo tanto, el uso de la expresión de estos genes no es un buen indicador de la competencia meiótica de los ovocitos de cabras prepúberes. No obstante, en la actualidad estamos realizando estudios de cuantificación proteica de las 2 subunidades del MPF así como de la actividad del complejo para poder complementar nuestros resultados. Así mismo, también estamos realizando un estudio sobre la competencia para el desarrollo embrionario

de cada grupo de tamaño de ovocitos para poderlo relacionar con nuestro estudio molecular.

Tabla 1. Estadío nuclear de ovocitos de cabras prepúberes en el momento de la recolección (0 horas) y tras la MIV (27 horas)

Ø (μm)	0 HORAS					27 HORAS				
	N	VG (%)	GVBD (%)	M I (%)	M II (%)	N	VG (%)	GVBD (%)	M I (%)	M II (%)
<110	75	62 (82.7) a	4 (5.3) a	2 (2.7)	0 (0)	138	117 (84.8) a	4 (2.9) ab	10 (7.2) a	5 (3.6) a
110-125	105	51 (48.6) b	28 (26.7) b	5 (4.7)	0 (0)	474	66 (13.9) b	19 (4) a	182 (38.4) b	200 (42.2) b
125-135	250	34 (13.6) c	161 (64.4) c	20 (8)	4 (1.6)	414	10 (2.4) c	7 (1.7) b	118 (28.5) c	267 (64.5) c
>135	198	3 (1.51) d	159 (80.3) d	15 (7.6)	4 (2)	70	0 (0) c	0 (0) ab	14 (20) c	50 (71.4) c

VG: vesícula germinal; GVBD: ruptura de VG; MI: metafase I; A-T: anafase-telofase MII: metafase II. Los valores en una misma columna con letras diferentes difieren significativamente (F, P< 0.05)

Tabla 2. Semi-cuantificación de la expresión del mRNA de p34cdc2 y Ciclina B1 en el momento de la recolección (0 horas) y tras la MIV (27 horas).

DIÁMETRO	0 HORAS (media±ds)		27 HORAS (media±ds)	
	$P34^{cdc2}$ mRNA	CICLINA B1 mRNA	$P34^{cdc2}$ mRNA	CICLINA B1 mRNA
<110 μm	0.36 ± 0.37 (n=5)	0.50 ± 0.07 (n=3)	0.41 ± 0.26 (n=7)	0.82 ± 0.45 (n=6)
110-125 μm	0.48 ± 0.55 (n=7)	0.96 ± 0.33 (n=6)	0.31 ± 0.30 (n=8)	0.90 ± 0.73 (n=7)
125-135 μm	0.29 ± 0.30 (n=7)	0.86 ± 0.33 (n=6)	0.25 ± 0.24 (n=7)	1.09 ± 0.87 (n=6)
>135 μm	0.27 ± 0.24 (n=8)	0.58 ± 0.37 (n=7)	0.27 ± 0.19 (n=7)	1.09 ± 0.74 (n=6)

Los valores en una misma columna con letras diferentes difieren significativamente (ANOVA, P< 0.05)

REFERENCIAS

1. Chesnel F y Eppig JJ. 1995. Mol Reprod Dev 40, 503-508.
2. Dedieu T y col. 1998. Mol Reprod Dev 50, 251-262
3. Gautier J y col. 1991. Cell 67, 197-211.
4. Labbé JC y col. 1989. Cell 57, 253-263.
5. Lévesque JT y Sirard MA. 1996. Biol Reprod 55, 1427-1436.
6. Naito K y col. 1992. Biol Reprod 47, 43-47.
7. Sun QY y col. 2001. Mol Reprod Dev 59, 192-198.
8. Zeuner y col. 2003. Theriogenology 59 1421-1433.