PATRONES NUCLEARES Y CITOPLASMÁTICOS DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OOCITOS DE CONEJA

Arias-Álvarez, M.[1], López-Béjar, M. [2], Rebollar, P.G. [3], García-García, R.M. [1], Lorenzo, P.L. [1]
[1] Dpto. Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
[2] Dpto. Anatomía y Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
[3] Dpto. Producción animal. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
pilar.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la fisiología de la reproducción es fundamental para mejorar los parámetros reproductivos en conejas sometidas a ritmos intensivos de producción, y para aumentar los rendimientos económicos de una granja cunícola. La lactación y el déficit en la condición corporal son los principales factores limitantes del éxito reproductivo. Por esto, se utilizan estrategias reproductivas y nutricionales, que permiten por un lado, inducir y sincronizar el celo en las conejas lactantes de forma efectiva, y por otro, paliar el déficit energético, sobre todo en las conejas primíparas. El ovario es el órgano diana sobre el que en última instancia actúan estas estrategias y cuya respuesta a los cambios endocrinos ocurridos, puede englobarse un gran número de procesos relacionados con el grado de maduración de los folículos y de sus oocitos antes de la ovulación y la fecundación.

Durante la oogénesis, los oocitos permanecen quiescentes en el estadio de diplotene de la profase I; esta fase se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente llamado vesícula germinal (VG). A lo largo del desarrollo folicular, el oocito crece pero permanece detenido en el mismo estadio, adquiriendo mientras tanto la capacidad de reiniciar y completar su maduración meiótica, necesaria para la preparación de su fecundación (Edwards, 1965; Sirard, 2001). La reanudación de la meiosis se identifica por la rotura de la membrana nuclear de la vesícula germinal y la progresión hasta el estadio de metafase de la segunda división meiótica (metafase II), pasando por la extrusión del primer corpúsculo polar y la expansión del cúmulo de células granulosas que rodean al gameto. Sin embargo, la maduración de los oocitos se refiere a dos sucesos biológicos diferenciados: a) maduración nuclear, referida a las modificaciones en la cromatina inicial, desde el estadio de VG hasta el de metafase II; b) maduración citoplásmica que, entre otros procesos, culmina con la migración de los gránulos corticales (GC) hacia la periferia del oocito para impedir la polispermia (Dulcibella *et al*., 1993; Hoodbhoy *et al*., 1994). El fracaso de cualquiera de estos aspectos durante la maduración origina la imposibilidad de una correcta fecundación y del adecuado desarrollo embrionario posterior (Sirard, 2001).

Este estudio pretende determinar los patrones de maduración nuclear y citoplasmática en oocitos de coneja cultivados *in vitro*, mediante la observación de los diferentes estadios nucleares meióticos y la migración de los gránulos corticales. El establecimiento de estos patrones es necesario como criterio morfológico previo, para evaluar cómo afectan las estrategias reproductivas y nutricionales sobre la formación de un oocito competente apto para ser ovulado y fecundado con normalidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y transporte de los ovarios. Los oocitos se obtuvieron de ovarios de conejas prepúberes y adultas sacrificadas en el matadero (Picañol S.L.). Se transportaron al laboratorio en un solución de PBS y antibiótico (50 μg/ml de gentamicina sulfato) a una temperatura de 37ºC.

Obtención, clasificación y selección de los oocitos. Se aspiró el contenido de los folículos antrales visibles en la superficie del ovario, superiores a 1mm de diámetro, (Jelinkova *et al*., 1994) con una aguja de 25 G conectada a una jeringa de 1 ml. Los complejos cúmulo oocito (COC) fueron seleccionados para cultivo en base a criterios

morfológicos de homogeneidad en el cúmulo y en el citoplasma descritos por Lorenzo *et al.* (1994,1996).

Maduración in vitro. Los oocitos se maduraron *in vitro* (IVM) según el protocolo de Izquierdo *et al.* (2001), con modificaciones adaptadas a la especie. El medio de maduración estaba compuesto por TCM-199, piruvato sódico (0,27mg/ml), glutamina 0,14 mg/ml, antibiótico (50 μg/ml de gentamicina sulfato), 10% de DBS (Suero de Donante Bovino), cisteamina (100μM), FSH (10μg/ml), LH (10μg/ml) y 17-β estradiol (1μg/ml). El cultivo se realizó en microgotas de 100 µl, en un incubador a 38,5ºC, con un 5% de CO2 y un 100% de humedad relativa, durante 18-20h.

Inmunofluorescencia. Los oocitos antes y después del cultivo *in vitro* fueron denudados de su cúmulo celular con hialuronidasa (2 mM) y se trataron con pronasa al 0,5% para digerir la zona pelúcida. Posteriormente se fijaron en una solución paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los oocitos se procesaron según el protocolo de Velilla *et al.* (2004), modificado por el Dr. López-Béjar, para realizar este estudio en oocitos de coneja con inmunofluorescencia. Se lavaron en primer lugar con una solución permeabilizante (PBS con 1% de Tritón X-100) durante 15 minutos, seguidos de dos lavados más, en PBS con 0,2% de Tritón X-100. Se pasaron a una solución bloqueante (PBS con 7,5% de BSA) durante 45 minutos y seguidamente se incubaron en una solución de 100 μg/ml de isotiocianato de fluoresceína conjugado con la aglutinina de la *lens culinaris* (FITC-LCA) en PBS durante una hora. La configuración nuclear se analizó mediante la tinción de los oocitos con DAPI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio sobre la maduración *in vitro* de oocitos de coneja nos ha servido para definir la técnica de inmunofluorescencia en esta especie e ir estableciendo los patrones predominantes nucleares y también los citoplasmáticos de los GC.

Patrones nucleares:

- VG. Se observa la presencia de núcleo rodeado por una membrana nuclear y cromatina laxa. Los oocitos no han reiniciado la meiosis. Dentro de esta configuración hemos encontrado 2 estadios morfológicos:
  - VG I; el núcleo esta caracterizado por la presencia de cromatina laxa en el que se distinguen las fibras de cromatina.
  - VG II: la cromatina esta condensada previa a la rotura de la VG.
- VGBD (Rotura de Vesícula Germinal). Desaparece la membrana nuclear. Se ha reanudado la meiosis. Con la técnica de inmunofluorescencia utilizada no se aprecia la membrana nuclear por lo tanto es difícil de establecer el momento de VGBD.
- M I (Metafase I). Cromosomas bivalentes condensados al máximo en el ecuador del huso acromático.
- M II (Metafase II). Cromosomas condensados en metafase y extrusión del primer corpúsculo polar. En los oocitos teñidos con la técnica descrita no se puede ver el corpúsculo polar debido a la ausencia de zona pelúcida, digerida previamente para poder permitir el paso del fluorocromo que tiñe los GC (FITC- LCA).

En contraste a lo que ocurre en otros mamíferos, en la coneja, otros autores han descrito la presencia de cromatina condensada en el estadio de VG (Motlik *et al*., 1989; Jelinkova et al., 1994; Ju *et al*., 2002) al igual que los resultados obtenidos en este estudio preliminar. Sin embargo, en el presente trabajo, sólo hemos podido diferenciar dos estadios en cuanto al grado de compactación de los cromosomas en VG, a diferencia de los cuatro que describe Jelinkova *at al*. (1994) teñidos con orceína, en función del tamaño del oocito y del folículo; o los tres clasificados por Ju *et al*. (2002), teñidos con Hoechst 33342.

Patrones de distribución de los gránulos corticales:

- Patrón difuso. GC distribuidos por la totalidad el citoplasma excepto en el espacio pericromosómico donde se encuentra la VG. La mayor parte de los oocitos (86,7%, sobre un total en los que ambas configuraciones, nuclear y citoplasmática, están claramente definidas) corresponden al estadio de VG.
- Patrón cortical. GC en la región cortical separados de la membrana plasmática. El mayor número de estos oocitos aparecen asociados a configuraciones nucleares de metafase (66,6%).

En este estudio no se ha podido determinar la existencia o ausencia de una distribución periférica completa de los GC. En otras especies, este patrón periférico se correspondería con una maduración citoplasmática correcta del oocito (Carneiro *et al*., 2002; Velilla *et al*., 2004). El que no hayamos podido definir este patrón puede ser debido a diferentes causas que dejan abiertas varias vías de actuación al respecto: 1) Que los oocitos de coneja madurados *in vitro* no consigan una migración total de los gránulos corticales. Por ello, sería de ayuda valorar y comparar estos patrones con oocitos madurados *in vivo*. 2) Que la visualización de los GC con un microscopio de fluorescencia convencional no permita la categorización de este patrón con suficiente exactitud; por lo tanto, sería adecuado un estudio de microscopía confocal, en el que obtendríamos cortes del oocito y una mayor fiabilidad para definir los diferentes tipos de patrones.

El resto de los patrones de distribución de los GC descritos para la coneja son similares a los observados en otras especies (Óseo y Shioga, 1997; cerdo: Sun *et al.*, 2001; caballo: Carneiro *et al.*, 2002; cabra: Velilla *et al*., 2004) en cuanto a que la migración de los GC está correlacionada en un alto porcentaje con el proceso de maduración nuclear. Si bien, también se observa que en algunos oocitos ambos procesos se desarrollan independientemente. Esto nos indica que para evaluar si existe una correcta maduración del oocito es necesario tener en cuenta ambos criterios; la migración periférica de los gránulos corticales acompañada de la presencia de metafase II.

Agradecimientos: A la Dra. Paramio (UAB) y al Dr. Revuelta (UCM) por su inestimable ayuda. Al matadero Picañol S.L. por su colaboración. M. Arias-Álvarez, es becaria predoctoral de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid y del Fondo Social Europeo (FSE). R.M. García-García, agradece la financiación al MEC mediante el programa Juan de la Cierva. El presente estudio ha sido financiado por un proyecto MEC (AGL 2005-0196) y el Programa de Ayudas a Grupos de Investigación (920249) de la UCM-CM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Carneiro G.F., Liu I.K.M., Hyde D., Anderson G.B., Lorenzo P.L., Ball B.A. 2002. Mol. Reprod. Dev. 63: 451–458. • Dulcibella T., Kurasawa S., Duffy P., Kopf G.S., Schultz R.M. 1993. Biol Reprod; 48 (6): 1251-1257. • Edwards R.G. 1965. Nature. 208: 349-351. • Izquierdo D., Villamediana P., Paramio M.T. 2001. Theriogenology. 56(5): 847-861. • Hoodbhoy T., Talbot P. 1994. Mol. Reprod. Dev. 39: 439- 448. • Hoosoe M., Shioga Y. 1997. Zygote. 5: 371- 376. • Jelinkova L., Kubelka M., Motlik J., Guerrier P., 1994. Mol. Reprod. Dev. 37: 210- 215. • Ju J.C., Chen T.H., Tseng J.K., Tsay C., Yeh S.P., Chou P.C., Chen C.H., Liu T.C. 2002. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15(12): 1695-1701. • Lorenzo P.L., Rebollar P.G., Illera M.J., Illera J.C., Illera M., Alvariño J.M.R. 1994. Arch. Zootecnia. 45:25-35.• Lorenzo P.L., Rebollar P.G., Illera M.J., Lorenzo P.L., Alvariño J.M.R. 1996. J. Reprod. Fert. 107: 109-117. • Motlik J., Fulka Jr J., Procházka R., Rimkevicova Z., Kubelka M., Fulka J.1989. Reprod. Nutr. Dev. 29: 601-609. • Sirard M.A. 2001. Theriogenology. 55: 1241- 1254. • Sun Q.Y., Lai L., Bonk A., Prather R.S., Schatten H. 2001. Mol. Reprod. Dev. 59:192- 198. •Velilla E., Izquierdo D., Rodríguez-González E., López-Béjar M., Vidal F., Paramio M.T. 2004. Mol. Reprod. Dev. 68: 507-514.