EFECTO DE LA APOPTOSIS EN EL COMPLEJO CUMULUS-OVOCITO DE CABRAS PREPÚBERES SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Anguita, B., Jiménez-Macedo, A.R., Romaguera, R., Paramio, M.T., Mogas,T., Izquierdo, D.
Dpto. Ciència Animal i dels aliments. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra (Barcelona). E-mail: Dolors.Izquierdo@uab.es

INTRODUCCIÓN

La apoptosis es el mecanismo que permite regular procesos biológicos mediante la eliminación de células defectuosas o que ya no son necesarias (Steller, 1995). En el ovario, la apoptosis es la responsable de la atresia folicular por la cual, muchos de los folículos presentes en el ovario durante el nacimiento no llegarán a ser ovulados. En hembras prepúberes, al igual que en las adultas, también se produce reclutamiento de folículos para su crecimiento, pero todos degeneran por atresia debido a la falta de la señal hormonal adecuada (Tilly y Tilly, 1995). El uso de ovarios procedentes de matadero supone obtener una población ovocitaria muy heterogénea. Además, cuando los ovocitos se recuperan de los ovarios mediante la técnica de *slicing* no se puede utilizar la morfología y el tamaño del folículo como criterio de selección. En este caso, el diámetro del ovocito y el aspecto del complejo cumulus-ovocito (COC) son los criterios más utilizados, aunque no es posible asegurar a simple vista la calidad de los mismos.

En nuestro laboratorio, Anguita *et al*. (2007) evaluaron el estadio nuclear de los ovocitos procedentes de cabras prepúberes inmediatamente después de su liberación de los folículos, y se observó que a medida que aumentaba el diámetro de los ovocitos se incrementaba el porcentaje de ovocitos que ya habían reanudado la meiosis. Los ovocitos que se encuentran dentro de los folículos están en parada meiótica y únicamente se produce la reanudación de la meiosis en el ovocito que contiene el folículo dominante después del pico de LH, o en folículos atrésicos debido a la expansión prematura de las células del cumulus. Así, la hipótesis de trabajo a desarrollar en este estudio se basa en que los ovarios de cabras prepúberes se caracterizan por presentar una población de ovocitos muy heterogénea en el grado de crecimiento y de atresia, hecho que sería responsable del bajo porcentaje de ovocitos que alcanzarían el estado de blastocisto en comparación con el desarrollo de los ovocitos de las cabras adultas, y que el grado de apoptosis se relaciona con el tamaño del ovocito y la morfología de su COC. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar en ovocitos de cabras prepúberes la incidencia de apoptosis en ovocitos y células del cumulus dependiendo, no sólo del diámetro ovocitario, sino también en la morfología del complejo cumulus-ovocito, y de qué modo influye en el posterior desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron ovarios de cabras prepúberes (45-60 días) en un matadero comercial. Los complejos cumulus-ovocitos (COCs) fueron liberados de sus folículos mediante la técnica de *slicing*. Los COC recuperados fueron clasificados en 2 grupos dependiendo de su morfología: sanos (S): ovocitos con el citoplasma homogéneo y cumulus compacto, y ovocitos con indicios de atresia (IA): ovocitos con el citoplasma heterogéneo y/o las células del cumulus empezando a expandirse. Posteriormente, se midió el diámetro del ovocito que contenía el COC y éstos se dividieron en 3 grupos adicionales: grupo A: 110-125 µm; grupo B: 125-135 µm; y grupo C: >135 µm. De cada uno de los 6 grupos experimentales se cogieron muestras de COCs al azar para evaluar la incidencia de apoptosis, tanto en los COCs como en los ovocitos denudados, mediante la técnica de TUNEL. Los COCs que no fueron utilizados para la detección de la apoptosis fueron MIV durante 27 horas en medio TCM199 suplementado con hormonas y cisteamina y FIV con espermatozoides procedentes de eyaculados frescos seleccionados mediante la técnica de swim-up y capacitados con heparina e ionomicina. Tras 24 horas de coincubación de los gametos en medio mDM, los presuntos cigotos se pusieron a cultivar durante 7 días en gotas de medio SOF (Takahashi y First, 1992) a 38,5 ºC en una atmósfera formada por un 5% CO_2, un 5% O_2 y un 90% N_2 y saturada de humedad para valorar su desarrollo embrionario. A las 48 hpi, se añadió 0,1 µl de suero fetal bovino (FBS) por cada ovocito presente en la gota. Al final del proceso, los

embriones fueron teñidos con Hoechst 33342 (Sigma, B-2261) para evaluar el número total de blastómeros mediante un microscopio de fluorescencia.

Evaluación de la apoptosis: Las muestras de ovocitos y COCs fueron fijadas en paraformaldehido al 4% a 4ºC hasta que se realizaba la tinción de TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick-end labelling). El protocolo de TUNEL (in situ cell death detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) fue realizado según las instrucciones del fabricante. Las muestras del control positivo fueron incubadas con 0.1 U/ µL DNAsa durante 1 hora a 37 ºC. El control negativo fue incubado en las mismas condiciones que el resto de grupos experimentales pero sin la presencia del enzima *Terminal deoxynucleotidyl transferase*. Posteriormente, los ovocitos y embriones fueron teñidos con ioduro de propidio (6.25 µg/ml; P-4170, Sigma) para diferenciar las células vivas de las muertas. Las muestras se evaluaron mediante un microscopio de fluorescencia. Las células apoptóticas mostraron núcleos fragmentados de color verde-amarillo, mientras que las no apoptóticas se observaron con el núcleo intacto de color rojo. Tras la técnica de TUNEL, los ovocitos denudados se clasificaron en: (1) apoptóticos, ovocitos con el núcleo fragmentado de color verde; y (2) no apoptóticos, ovocitos con el núcleo intacto de color rojo. Al mismo tiempo se valoró el estadio de maduración nuclear de los ovocitos. Respecto a los COCs, dependiendo de la distribución de las células TUNEL positivas, éstos fueron clasificados como: (1) COC Viable, sin células del cumulus apoptóticas y (2) COC con apoptosis.

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Graph-Pad Instat 3.01 para Windows (Graph-Pad software, San Diego, California, USA). Para comparar la proporción de células TUNEL positivas entre los diferentes grupos de ovocitos y de COCs y el desarrollo embrionario se utilizó un Fisher's exact test. Los datos sobre el número medio de células de los blastocistos fueron analizados mediante un análisis de la varianza con un post-test de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio para ver en qué estadio nuclear se encontraban los ovocitos de cabras prepúberes inmediatamente después de su liberación de los folículos, observamos que a medida que aumentaba su diámetro se incrementaba el porcentaje de ovocitos que ya habían reanudado la meiosis (Anguita *et al*., 2007). En consecuencia, nuestros resultados parecían indicar que la mayoría de ovocitos recuperados de cabras prepúberes eran atrésicos, y que la atresia aumentaba con el diámetro ovocitario. No obstante, en este trabajo y tal como se muestra en la Tabla 1, cuando el COC presentaba una morfología sana, los ovocitos de mayor diámetro son los que proporcionaron un nivel de apoptosis menor en el momento de la recogida, no observándose diferencias estadísticas entre los 3 tamaños de ovocitos estudiados procedentes de COCs con indicios de atresia.

Al evaluar la apoptosis en las células del cumulus de los COC (Tabla 1), los ovocitos de menor diámetro, independientemente de su morfología, fueron los que mostraron un mayor porcentaje de COCs con células del cumulus apoptóticas. Respecto al desarrollo embrionario, diversos estudios han descrito que los COCs que muestran signos tempranos de atresia dan lugar a un mayor porcentaje de blastocistos (Blondin y Sirard, 1995; Boni *et al*., 2002), debido a que estos COCs sufren un proceso similar a la maduración dentro del folículo (Assey *et al*., 1994). No obstante, en nuestras condiciones, los COCs que no presentaron signos de atresia y cuyo ovocito era de tamaño superior a 135 µm fueron los que proporcionaron un mayor porcentaje de blastocistos (Tabla 2). La importancia del diámetro sobre el desarrollo embrionario ya había sido descrita previamente tanto en cabras prepúberes (Anguita *et al*., 2007) como adultas (Crozet *et al*., 1995).

Respecto a la morfología del COC, parece que ésta es determinante cuando el ovocito ya ha finalizado su crecimiento (>135 µm) pero no antes, ya que no hemos observado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a producción de embriones, de mórulas y de blastocistos entre los COC sanos y los que presentaban indicios de atresia cuando los ovocitos tenían el mismo rango de diámetro y éste era inferior a 135 µm (Tabla 2). Al estudiar la calidad de los blastocistos obtenidos, evaluada según el número de células de los blastocistos, en cabras prepúberes ésta no parece verse afectada por la morfología del COC y el diámetro ovocitario. En conclusión, el diámetro del ovocito y la morfología del COC son

buenos indicadores de la competencia ovocitaria para producir embriones en cabras prepúberes. No obstante, la selección de los COCs mediante su morfología antes de la MIV incrementa el porcentaje de blastocistos sólo en los ovocitos que han completado su crecimiento. Así, para obtener el mayor porcentaje de blastocistos deben seleccionarse los COCs con un diámetro ovocitario superior a 135 µm y sin signos visibles de atresia.

Tabla 1. Nivel de apoptosis en ovocitos y Complejos cumulus-ovocito (COC) inmaduros dependiendo del diámetro del ovocito y la morfología del COC que lo contiene.

	Sanos			**Indicios atresia**		
	110-125 µm	*125-135 µm*	*>135 µm*	*110-125 µm*	*125-135 µm*	*>135 µm*
Ovocitos apoptóticos/ Ovocitos evaluados (%)	33/64 [a] (51,5)	45/104 [a] (43,3)	8/66 [b] (12,1)	7/60 [b] (11,7)	18/91 [b] (19,8)	14/55 [b] (25,4)
COCs con CCs apoptóticas/ COCs evaluados (%)	75/82 [a] (91,5)	73/111 [b] (65,7)	37/57 [bd] (64,9)	42/47 [ac] (89,4)	60/75 [acd] (80,0)	40/51 [bcd] (78,4)

CCs: células del cumulus. Valores en la misma fila con distintos superíndices ([a, b, c, d]) difieren significativamente (p<0,05).

Tabla 2. Desarrollo embrionario y calidad de los blastocistos según la morfología del COC y el diámetro ovocitario

	Ø (µm)	N	Total Div (%)	Mor (%)	Blast. (%)	Nº medio células blast.
Sanos	*110-125 µm*	222	71 [a] (32)	4 [a] (1,8)	0 [a]	
	125-135 µm	510	303 [b] (59.4)	20 [ab] (3,9)	27 [b] (5,3)	92,5± 51,9
	>135 µm	230	165 [c] (71,7)	16 [bc] (7)	33 [c] (14,3)	128,9± 81,4
Indicios Atresia	*110-125 µm*	284	95 [a] (33,4)	5 [a] (1,8)	1 [a] (0,3)	146
	125-135 µm	463	292 [b] (63,1)	13 [a] (2,8)	19 [b] (4,1)	106,7± 77,1
	>135 µm	215	145 [c] (68,8)	17 [c] (7,9)	11 [b] (5,1)	107,4± 67,7

N: ovocitos inseminados; Div: total de embriones; Mor: mórulas; Blast: blastocistos; Valores en la misma columna con distintos superíndices ([a, b]) difieren significativamente (P<0.05).

BIBLIOGRAFÍA

• Anguita B, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. 2007. Effect of oocyte diameter on meiotic competente, embryo development, p34 (cdc2) expresión and MPF activity in prepubertal gota oocytes. Theriogenology 67: 526-536. • Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. Mol Reprod Dev 37(3):335-344. • Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 41(1):54-62. • Boni R, Cuomo A, Tosti E. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. Biol Reprod 66(3):836-842. • Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. J Reprod Fertil 103: 293-298. • Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267: 1445-1449. • Takahashi Y, First N. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology 37: 963-78. • Tilly JL, Tilly KI. 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. Endocrinology 136(1):242-252.