SELECCIÓN DE OOCITOS DE CORDERA MEDIANTE LA TINCION DEL *BRILLIANT CRESYL BLUE* PARA LA PRODUCCION DE BLASTOCISTOS MEDIANTE FIV E ICSI

Catalá, M.G., Hammami, S., Roura, M., Romaguera, R., Morató, R., Izquierdo, D. y Paramio M.T.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. España. Teresa.Paramio@uab.es

INTRODUCCIÓN

Las diferentes tecnologías de reproducción asistida (ART) son una herramienta importante para aumentar la productividad de la industria ganadera. La inseminación artificial (IA) es la ART más utilizada en este sector y ha supuesto un fuerte impacto en la Producción Animal al incrementar la ganancia genética utilizando machos de alto valor genético. En hembras, la MOET (Ovulación múltiple y transferencia de embriones), fecundación in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) utilizadas para producir embriones *in vitro* serán esenciales para incrementar la difusión genética de las hembras como la IA lo ha logrado con los machos. Diversos investigadores han demostrado que gran parte del éxito en la producción in vitro de embriones depende de la calidad del oocito (revisado por Sirard, 2011).

La calidad o competencia del oocito se adquiere gradualmente durante el transcurso de la foliculogénesis y se define como la capacidad de un oocito para reasumir la meiosis, dividirse después de ser fecundado, llegar al estadio de blastocisto y llevar a término una preñez. Se ha demostrado que existen diferentes factores que afectan a la calidad del oocito entre los que se encuentran el diámetro del oocito, diámetro folicular (Gandolfi et al., 1998), fase de la onda folicular (Machatkova*a* et al., 2004), estimulación hormonal (Sirar*d* et al., 2006), estación del año (Sartor*i* et al., 2002), nutrición (Fouladi-Nasht*a* et al., 2007) y edad de la donante (Rizo*s* et al., 2005), entre otros.

En nuestro laboratorio tenemos como objetivo seleccionar, entre un *pool* heterogéneo de oocitos obtenidos a partir de ovarios de matadero, los oocitos más competentes para producir embriones in vitro. El *brilliant cresyl blue* (BCB) es una tinción vital que determina la presencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FD) perteneciente al ciclo de las pentosas. La G6FD está presente en todas las células, incluyendo los oocitos, en donde se encuentra con alta actividad en los oocitos que aún están en fase de crecimiento (BCB-) y con baja actividad en oocitos que ya han alcanzado la fase final de crecimiento y son más competentes para ser fecundados (BCB+). Por lo tanto, los oocitos con poca actividad de la G6FD son incapaces de degradar el BCB y los oocitos se quedan teñidos de azul. Sin embargo los oocitos con alta actividad de la G6PD degradan el colorante y su citoplasma permanece incoloro (BCB-).

El objetivo del presente estudio es analizar la tinción del BCB en oocitos de corderas estudiando parámetros moleculares que están directamente relacionados con la competencia del oocito como son: la actividad de las mitocondrias, del MPF (factor promotor de la maduración) y la concentración intracelular del ATP. También se estudió el desarrollo hasta blastocistos de estos oocitos después de FIV y de la ICSI así como la calidad de estos embriones contando el número de células embrionarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los oocitos se recuperaron mediante la técnica de *slicing* de ovarios de matadero de corderas de 3 a 6 meses de edad. Se seleccionaron los oocitos con 3 o más capas de células del cúmulus (COCs) y citoplasma homogéneo. Los COCs, se incubaron durante 1 hora en el BCB (26 µM BCB) a 38,5ºC y 100% de humedad. La valoración de la tinción se realizó en un microscopio estereoscópico y según la coloración, los oocitos fueron clasificados como oocitos teñidos de azul y que previsiblemente han finalizado su crecimiento (BCB+) y oocitos sin teñir o en fase de crecimiento (BCB-). Una vez seleccionados los oocitos BCB+ y BCB- se analizó la actividad mitocondrial utilizando el mitotracker orange CMTMRos (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), la concentración del ATP mediante un kit de bioluminiscencia (Sigma bioluminescence FLASC kit, St Louis, MO, EE.UU.) y la actividad del MPF mediante el análisis de la CDC2 quinasa (MESACUP CDC2, MBL, Madrid, España). Posteriormente los oocitos restantes seleccionados como BCB+ y BCB- se sometieron a una FIV e ICSI y mediante una tinción con Hoechst 33258 se

analizó el número de blastómeros de los blastocistos producidos mediante las 2 técnicas (Catalá et al., 2012). Para el análisis de embriones, se realizó un test de Fisher, mientras que para las mitocondrias, MPF y ATP se realizó un PROD MIXED del programa SAS (version 9.1; SAS Institute Inc., EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que los oocitos BCB+ produjeron significativamente mayor porcentaje de blastocistos que los BCB- cuando se realizó la FIV, mientras que los oocitos BCB+ y BCB- produjeron porcentajes similares de blastocistos cuando se los sometió a una ICSI. En humanos se utiliza la ICSI en casos de infertilidad mejorando significativamente las tasas de fertilidad (Westerlaken et al., 2005). Los oocitos utilizados para la ICSI son previamente seleccionados por su maduración nuclear (oocitos en metafase II), mientras que con la FIV no conocemos este parámetro. En nuestro caso podemos decir que la ICSI pudo mejorar la fertilización de los oocitos BCB- obteniendo resultados similares que con los BCB+. A pesar de la mejoría en el número de blastocistos en los BCB- con la ICSI, sin embargo el número de blastómeros es menor en los BCB- que en los blastocistos provenientes de oocitos BCB+. Siendo el número de blastómeros un síntoma de calidad de blastocistos (Holm P et al., 2002), podemos concluir que los blastocistos BCB- son de menor calidad que los blastocistos BCB+, Estos resultados se presentan en Tabla 1.

En la Figura 1 se presentan los resultados obtenidos en relación a la actividad mitocondrial, la actividad del MPF y la concentración intracelular del ATP. En los tres análisis, los oocitos BCB+ presentaron significativamente ($P<0,05$) mayor actividad mitocondrial, MPF y concentración de ATP que los oocitos BCB-. En humanos se encontró una relación entre los oocitos con mayor actividad mitocondrial y por lo tanto una mayor producción de ATP (fuente principal de energía celular) concluyendo en una mayor viabilidad de los embriones producidos (Van Blerkom et al., 1995). Por lo tanto consideramos que una mayor actividad mitocondrial y concentración del ATP es un síntoma de buena calidad y que en corderas y bajo nuestras condiciones de trabajo, los oocitos BCB+ cumplen con esta característica. En el caso del MPF, Salamone et al. (2001) y Ledda et al. (2001) demostraron tanto en vacas y ovejas, que los oocitos provenientes de animales prepúberes tienen menor actividad del MPF que oocitos provenientes de animales adultos y que está estrechamente relacionado con una menor producción de embriones. Estos resultados son similares a los nuestros en donde los oocitos BCB- tienen menor actividad del MPF mostrando su menor calidad en comparación a los BCB+. En conclusión, la tinción del BCB logra diferenciar dos poblaciones citoplasmáticamente diferentes partiendo de un grupo heterogéneo de oocitos; los BCB+: oocitos con mayor actividad mitocondrial, mayor concentración de ATP, mayor actividad del MPF y mayor tasa de fecundación con mayor probabilidad de éxito ya que sus embriones poseen más blastómeros; BCB-, oocitos con menor actividad mitocondrial, ATP, MPF, embriones y blastómeros por embrión. Poder diferenciar dos poblaciones de oocitos puede ser de gran utilidad a nivel científico para poder analizar con más profundidad las diferencias entre estos oocitos y poder encontrar nuevas teorías sobre la fertilidad y a nivel práctico para mejorar la producción in vitro de embriones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Catalá MG, Izquierdo D, Rodríguez-Prado M, Hammami S & Paramio MT. Fert & Ster. 1004-8 • Fouladi-Nashta AA, Gutierrez CG, Gong JG, Garnsworthy PC & Webb R 2007. Biol. of Reprod. (77) 9-17 • Gandolfi F, Milanesi E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TAL, Acocella F, Lauria A & Armstrong DT 1998. Mol. Reprod. & Dev. (49) 168-75 • Holm,P.; Booth,P.J.; Callesen,H. 2002 Reprod. (123) 4:553-65 • Ledda,S.; Bogliolo,L.; Leoni,G.; Naitana,S. 2001 Biol. of Reprod. (65) 1:247-52 • Machatkovaa M, Krausovaa K, Jokesovaa E & Tomanekb M 2004 Theriog. (61) 329-35 • Salamone,D.F.; Damiani,P.; Fissore,R.A.; Roble,J.M.; Duby,R.T.l 2001 Biol. of Reprod. (64) 6:1761-68 • Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee JF, O'Farrell KJ, MacSiurtain M, Boland MP & Lonergan P 2005. Theriog. (63) 939-49 • Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ & Wiltbank MC 2002. J. D.Sci. (85)2803-12 • Sirard MA 2011 J. of Ass.Reprod. & Gen. (28)483-88 • Sirard MA, Richard F, Blondin P & Robert C 2006. Theriog. (65)126-36. • Van Blerkom,J.; Davis,P.W.; Lee,J.1995 Hum. Reprod. ; 10:415-24. • Westerlaken,L.; Helmerhorst,F.; Dieben,S.; Naaktgeboren,N.2005 Fert. & Ster.(83)3:612-7.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto ***AGL 2011-23784***.

Tabla 1. *Desarrollo embrionario a día 7 post inseminación de los oocitos de cordera seleccionados mediante la tinción del BCB después de ser Fecundados in vitro (FIV) o mediante la Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)*

	% de blastocistos FIV	% de blastocistos ICSI	n blastómeros /blastocisto
BCB+	31,7%^{aA}	18,6%^{B}	70.4±7.9^{c}
BCB-	6,7%^{b}	14,8%	49.1±4.6^{d}

El porcentaje de blastocistos se calculó entre el total de oocitos puestos a fecundar. El número de blastómeros se calculó sobre el total de blastocistos producidos por FIV e ICSI Los valores diferente letra difieren significativamente (Test de Fisher, P<0,05).

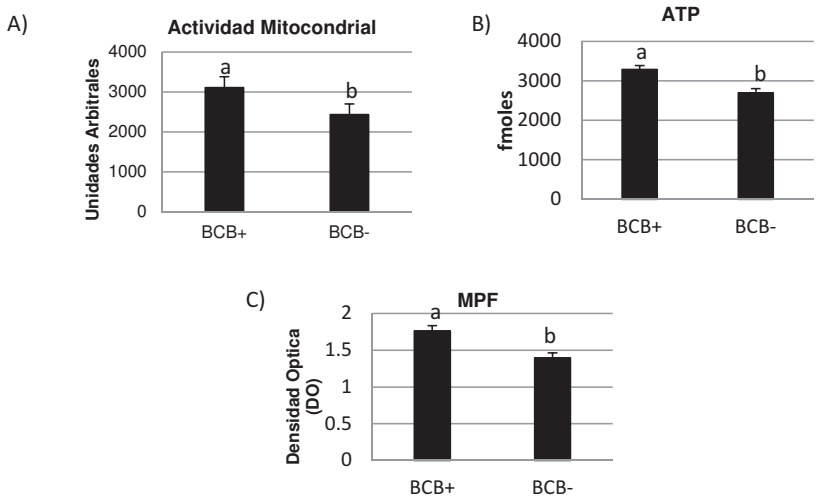


Figura 1. *Actividad mitocondrial, actividad del MPF y concentración del ATP en oocitos de cordera seleccionados mediante la tinción del BCB.* $^{(a,b)}$*indican diferencias P<0,05.*

LAMB OOCYTE SELECTION BY THE BRILLIANT CRESYL BLUE (BCB) STAIN FOR THE EMBRYO PRODUCTION BY IVF AND ICSI

ABSTRACT: The aim of this study was to select more competent lamb oocytes by BCB staining. Oocytes were recovered by slicing from slaughterhouse ovaries and stained with 26 µM BCB during 1 h and then separated into two groups: blue oocytes or oocytes that have reached their growth phase (BCB+) and unstained or growing oocytes (BCB-). Both groups of oocytes were submitted to analysis of mitochondria using the mitotracker orange CMTMRos, MPF (Maturation-Promoting-Factor) by CDC2 kinase analysis and ATP content by a bioluminescence kit. After in vitro maturation, oocytes were in vitro fertilized (IVF) and fertilized by ICSI. Blastocysts were recorded at day 7 post-fertilization and stained with Hoechst to assess the blastomer number. The BCB+ oocytes have more active mitochondria, MPF and ATP content than BCB- oocytes. In addition, BCB+ oocytes produced significantly more blastocysts after IVF than BCB- oocyte (32 and 7%, respectively). However, these differences in blastocysts production were not found after ICSI (19 and 15%, respectively). The blastocysts produced from BCB+ oocytes showed more blastomeres in spite of the fertilization method. In conclusion, BCB stain allows selecting more competent lamb oocytes for IVF programs but, it is not necessary using ICSI.

Keywords: BCB, IVF, ICSI, lamb.