

TEST DE BCB Y MADURACION EN PRESENCIA DE CISTEAMINA PARA MEJORAR LA EFICACIA DE LA PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES PROCEDENTES DE OVOCITOS DE CABRAS PREPUBERES

Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Velilla, E., Paramio Nieto M.T.
Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici V, 08193 Bellaterra. Barcelona

INTRODUCCIÓN

El reducido número de blastocistos obtenidos in vitro a partir de ovocitos de cabras prepúberes se debe probablemente a una maduración citoplasmática incorrecta, reflejada por una elevada incidencia de anomalías detectadas tras la FIV, como la poliespermia, la incompetencia para formar el pronúcleo masculino (Martino y col., 1994, 1995; Mogas y col., 1997) y la haploidía observada en embriones de 2-4 células (Villamediana y col., 1998).

En caprino, Crozet y col. (1995) han demostrado que la competencia del ovocito para producir blastocistos está determinada por la finalización de la fase de crecimiento en el folículo. El test de Azul de Cresol Brillante (BCB) es un método colorimétrico que permite determinar la actividad intracelular de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), un enzima únicamente presente en la fase de crecimiento del ovocito (Ericsson y col., 1993). El test de BCB ha sido empleado con éxito como método de selección de ovocitos porcinos útiles para MIV-FIV (Ericsson y col., 1993) y para el ensayo de penetración homóloga in vitro (Roca y col., 1998). Asimismo, se ha empleado en la selección de ovocitos más competentes para la producción de embriones a partir de ovocitos inmaduros de terneras (Pujol y col., 2000) y de cabras prepúberes (Rodríguez-González y col., 2000).

Por otro lado, se ha demostrado que la inclusión de cisteamina en el medio de MIV estimula la síntesis de glutatión intracelular en los ovocitos (vaca: De Matos y col., 1995, 1996, 1997; oveja: De Matos y col., 1999; cerdo: Yamauchi y Nagai, 1999), incrementa la proporción de ovocitos capaces de formar el pronúcleo masculino tras la FIV (cerdo: Grupen y col., 1995; hámster: Kito y Bavister, 1997; cabra prepúber: Rodríguez-González y col., 2001) y estimula el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (vaca: De Matos y col., 1995, 1996; cerdo: Grupen y col., 1995; Yamauchi y Nagai, 1999).

El objetivo de este estudio ha sido analizar si la selección de ovocitos mediante el test de BCB y la MIV en presencia de cisteamina permiten mejorar la maduración citoplasmática y, consecuentemente, aumentar la producción de blastocistos in vitro a partir de ovocitos de cabras prepúberes.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de los ovocitos

Se recogieron ovarios de cabras de aproximadamente 2 meses de edad en un matadero comercial y se transportaron al laboratorio en PBS con 50 µg/mL gentamicina a 37°C. Los ovocitos se obtuvieron mediante slicing, en TCM199/HEPES suplementado con 11,1 µg/mL heparina sódica, 2% (v/v) suero bovino de macho castrado (SS) y 50 µg/mL gentamicina.

Test de BCB

Los ovocitos obtenidos se lavaron 3 veces en PBS modificado por la adición de 1.09 mg/mL glucosa, 35.2 mg/mL piruvato, 0.4% (w/v) BSA y 50 µg/mL gentamicina (mPBS). Tras ello, los ovocitos se expusieron a 26 µmol/L de BCB (Sigma, B-5388) diluido en mPBS durante 90 min a 38.5°C. Tras la exposición a BCB, los ovocitos se lavaron 3 veces en mPBS y se clasificaron en 2 grupos según la coloración de su citoplasma: BCB+ (ovocitos que mostraron una coloración azul del citoplasma) y BCB- (ovocitos que no presentaron esta coloración). Tras la clasificación, los ovocitos, se lavaron 3 veces en el medio de maduración y se pusieron a cultivar.

Maduración in vitro (MIV) de los ovocitos

La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 100 µL de medio TCM199 suplementado con 2750 µg/mL piruvato sódico, 146 µg/mL L-glutamina, 50 µg/mL

gentamicina, 10% (v/v) suero SS, 10 µg/mL LH, 10 µg/mL o-FSH, 1 µg/mL 17β estradiol y 100 µM cisteamina. Los ovocitos se cultivaron durante 27 h a 38.5° C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad. Paralelamente, se realizó un control de ovocitos no expuestos al test de BCB y madurados en el citado medio de MIV, pero libre de cisteamina. Al final del cultivo, se tiñó una muestra de los ovocitos con lacmoide al 1% y se evaluó el estadio nuclear.

Selección y capacitación de los espermatozoides

Los espermatozoides, recogidos mediante vagina artificial, se lavaron y seleccionaron mediante la técnica de swim-up: se colocaron 2 ml de medio mDM (Brackett and Oliphant, 1975; modificado por Younis y col., 1991) en 3 tubos cónicos y se depositaron 70 µL de semen en el fondo de cada tubo. Se incubaron durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad. Se recogieron aproximadamente 600 µl del sobrenadante de cada tubo y se mezclaron en un tubo estéril de centrifuga que se centrifugó a 200 x g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se mezcló con un volumen igual de medio de capacitación mDM suplementado con 100 µg/mL heparina, siendo la concentración final de esta suspensión de 84x10⁶ spz/mL aproximadamente. Esta suspensión se incubó durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Fecundación in vitro (FIV) de los ovocitos

Tras 27 horas de maduración, los ovocitos se lavaron en medio de fecundación. La FIV se realizó en microgotas de 100 µL de medio de fecundación TALP (modified Tyrode's medium definido por Parrish y col., 1986), suplementado con 1 µg/ml hipotaurina. Se colocaron 20-25 ovocitos/microgota y se inseminaron con una alícuota (5 µL) de la suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final de aproximadamente 3.5x10⁶ espermatozoides/ml. El co-cultivo se mantuvo durante 24 h a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad. Se tomó una muestra de los ovocitos a las 20 horas post-inseminación y se evaluó el estadio nuclear mediante lacmoide al 1%.

Cultivo embrionario in vitro (CIV)

El cultivo in vitro (CIV) se realizó en microgotas (1 µL medio de cultivo/embrión) de fluido oviductal sintético (SOF, Takahashi y First, 1992) cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35x10 mm, a 38.5°C en una atmósfera de 90% de N₂, 5% de CO₂ y 5% de O₂. Los presuntos embriones se mantuvieron en cultivo durante 7 días (8 días post-inseminación). A las 24 h del inicio del cultivo (es decir, a las 48 h post-inseminación) se añadió a las microgotas un 10% (v/v) de suero SS (0.1 µL suero/embrión). A los 7 días del inicio del cultivo (8 días post-inseminación) se valoró el desarrollo embrionario alcanzado mediante tinción de Hoechst 33342.

Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos de tratamiento se calcularon mediante el test de χ^2 . Se consideraron significativas las diferencias con un valor de probabilidad < 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se exponen los resultados obtenidos tras 27 h de MIV y 20 h post-inseminación. En presencia de cisteamina, los ovocitos BCB+ mostraron tasas superiores de maduración nuclear (P<0.001) y de formación de los 2 pronúcleos (P<0.01), así como un menor porcentaje de cabezas espermáticas que no formaron el pronúcleo masculino (P<0.05), respecto a los ovocitos BCB- y a los ovocitos control madurados en un medio libre de cisteamina.

Tabla 1. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de MIV sobre la maduración nuclear y la FIV de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=3)

Tratamiento	MIV			FIV			
	Número total de ovocitos	MII n (%)	Número total de ovocitos	Fecundación n (%)	2 Pronúcleos n (%)	Asincronía n (%)	Poliespermia n (%)
Cisteamina							
BCB+	105	94 (89.5) ^a	116	66 (56.9)	46 (39.7) ^a	2 (1.7) ^c	18 (15.5)
BCB-	219	158 (72.1) ^{bc}	286	132 (46.2)	60 (21.0) ^b	24 (8.4) ^{ab}	48 (16.8)
Total	324	252 (77.8) ^b	402	198 (49.3)	106 (26.4) ^b	26 (6.5) ^{bc}	66 (16.4)
Control	150	101 (67.3) ^c	144	78 (54.2)	32 (22.2) ^b	32 (22.2) ^b	20 (13.9) ^a

MI: Metafase II; Fecundación: una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado; ^{a,b,c} Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

En la Tabla 2 se muestran los valores relativos al desarrollo embrionario in vitro a los 8 días post-inseminación. Los ovocitos BCB+ mostraron mayores tasas de embriones totales ($P < 0.05$), de embriones que superaron el estadio de 8 células ($P < 0.0001$) y de mórulas y blastocistos ($P < 0.001$) que los ovocitos BCB-. Asimismo, la proporción de ovocitos BCB+ que progresaron más allá del estadio 8 células fue superior ($P < 0.001$) que en el control de ovocitos madurados en ausencia de cisteamina.

Tabla 2. Efecto del test de BCB y la adición de cisteamina en el medio de MIV sobre el desarrollo embrionario in vitro de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=3)

Tratamiento	Número total de ovocitos inseminados	Desarrollo embrionario a los 8 d post-inseminación			
		Embriones totales n (%)	Embriones ≥ 8 células n (%) [*]	Mórulas + blastocistos n (%) [*]	Blastocistos expandidos n (%) [*]
Cisteamina					
BCB+	139	63 (48.8) ^a	43 (68.3) ^a	15 (23.8) ^a	5 (7.9)
BCB-	392	137 (34.9) ^b	29 (21.2) ^c	7 (5.1) ^b	4 (2.9)
Total	531	200 (37.7) ^{ab}	72 (36.0) ^b	22 (11.0) ^b	9 (4.5)
Control	111	47 (42.3) ^{ab}	15 (31.9) ^{bc}	6 (12.8) ^{ab}	0 (0)

^{*} Porcentajes calculados respecto al total de embriones; ^{a,b,c} Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

En conclusión, la selección de ovocitos de cabras prepúberes mediante el test de BCB y su posterior maduración en un medio suplementado con cisteamina es un sistema eficaz de obtención de ovocitos maduros para programas de MIV-FIV-CIV, ya que permite seleccionar ovocitos con mayor capacidad de desarrollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brackett y Oliphant (1975). Biol. Repr. 12: 260-274
 Crozet y col. (1995). J. Repr. Fert. 103: 293-298
 De Matos y col. (1995). Mol. Repr. Dev. 42: 432-436
 De Matos y col. (1996). Mol. Repr. Dev. 45: 451-457
 De Matos y col. (1997). Biol. Repr. 57: 1420-1425
 Erickson y col. (1993). Therio. 39:214 abstr
 Grupen y col. (1995). Biol. Repr. 53: 173-178
 Kito y Bavister (1997). J. Repr. Fert. 110: 35-46
 Martino y col. (1994). Therio. 42: 859-873
 Martino y col. (1995). Therio. 43: 473-485
 Mogas y col. (1997). Therio. 48: 815-829
 Parrish y col. (1986). Therio. 25: 591-600
 Pujol y col. (2000). Therio. 53:466 abstr.
 Roca y col. (1998). Reprod. Fert. Dev. 10:479-485
 Rodríguez-González y col. (2000) AETE, 196
 Rodríguez-González y col. (2001). Therio. 55:493
 Takahashi y First (1992). Therio. 37:963-978
 Villamediana y col. (1998). Sero Symposia: 612
 Yamauchi y Nagai (1999). Biol. Repr. 61: 828-833
 Younis y col. (1991). Biol. Repr. 44. 1177-1182