

## ESTUDIO DE UN MEDIO DE CRECIMIENTO ANTES DE LA MADURACION IN VITRO EN OVOCITOS DE CORDERAS DE BAJA CALIDAD SELECCIONADOS MEDIANTE LA TINCIÓN DEL AZUL DE CRESOL BRILLANTE

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

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

### INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones es poco eficiente en comparación con la producción de embriones *in vivo* (Rizos et al., 2002; Cognie et al., 2003). Desde los años 80 no se ha conseguido aumentar significativamente la producción de blastocitos producidos *in vitro* (máximo del 40%) en las especies ganaderas. La eficacia de esta técnica es aún peor cuando se trabaja con animales prepúberes como donantes de ovocitos. Utilizar este tipo de ovocitos tiene la ventaja de poder acortar el intervalo entre generaciones incrementando así la intensidad de selección, sin embargo estos ovocitos se caracterizan por tener una maduración citoplasmática anormal y una menor capacidad de alcanzar la fase de blastocisto comparado con los ovocitos de donantes adultas (Armstrong, 2001). Resultados en cabras (Rodríguez-Gonzalez et al., 2002), vacas (Pujol et al., 2004), y cerdos (Egerszegi et al., 2010) demostraron que el test del azul de cresol brillante (BCB) es efectivo para seleccionar los ovocitos más competentes para alcanzar el estadio de blastocisto. El BCB es una tinción vital que determina la actividad intracelular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima que se sintetiza dentro del ovocito durante la fase de crecimiento disminuyendo su actividad al completar la misma. Por lo tanto, ovocitos que hayan completado su crecimiento tendrán la G6PDH con baja actividad siendo incapaces de reducir el colorante (BCB+: ovocitos de color azul), mientras que los ovocitos que aun están en fase de crecimiento tendrán una alta actividad de la enzima reduciendo el colorante a una tonalidad más clara (BCB-: ovocitos incoloros).

De Wu et al. (2006) utilizando un medio de crecimiento durante las primeras horas de la maduración *in vitro* (MIV), lograron incrementar el número de blastocistos obtenidos de ovocitos porcinos de menor calidad provenientes de folículos pequeños.

El objetivo de este estudio es incrementar el desarrollo hasta blastocisto de los ovocitos de cordera seleccionados mediante la tinción del BCB utilizando para el ello el medio de crecimiento propuesto por De Wu et al. (2006) durante las 12 primeras horas de maduración *in vitro*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos se recuperaron mediante la técnica de *slicing* de ovarios de corderas de 3 a 6 meses de edad. Se seleccionaron los ovocitos con 3 o más capas de células del cúmulus (COCs) y citoplasma homogéneo. Los COCs, se incubaron en una solución de 13  $\mu$ M BCB durante 1 h a 38,5°C y 100% de humedad. Finalizado dicho período, se lavaron repetidas veces en medio PBS para eliminar posibles restos de colorante. La valoración de la tinción se realizó en un microscopio estereoscópico con el diafragma parcial o totalmente cerrado. Según la coloración, los ovocitos fueron clasificados como ovocitos que han finalizado su crecimiento (BCB+) y ovocitos en fase de crecimiento (BCB-). La MIV se llevó a cabo adaptando los protocolos de Ptak et al. (2006), Grazul-Bilska et al. (2003) y De Wu et al. (2006). Los medios utilizados durante la maduración fueron los siguientes:

**MC** (Medio de Crecimiento): TCM 199 suplementado con 0,04  $\mu$ g/mL de FSH, 0,04  $\mu$ g/mL de LH, 0,004  $\mu$ g/mL de estradiol, 100  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico y 5  $\mu$ L/mL ITS (insulina, transferrina y selenio).

**MT** (Medio de Maduración Tradicional): TCM199 suplementado con 5  $\mu$ L/mL de FSH, 5 de  $\mu$ g/mL LH, 1  $\mu$ L/mL de 17 $\beta$  estradiol.

En los dos casos, los medios fueron suplementados con 10 ng/mL EGF, 0,2 mM piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 100  $\mu$ M cisteamina, 10% (v/v) FBS (suero fetal bovino), 2% (v/v) antibiótico-antimicótico.

Los COCs seleccionados como BCB- fueron colocados en placas de 4 pocillos con 500  $\mu$ L de medio **MC** cubiertos con 200  $\mu$ L de aceite mineral durante 12 h. Pasado este tiempo, se transfirieron a medio **MT** durante 12 h más para completar su tiempo de maduración. A su vez, ovocitos BCB+ y BCB- se maduraron en placas de 4 pocillos con 500  $\mu$ L de medio **MT** durante 24 h. En todos los grupos, la MIV se llevó a cabo a 38,5 °C, en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad.

Para la fecundación *in vitro* (FIV), se utilizó una mezcla de semen fresco de 3 machos de fertilidad previamente comprobada. Los espermatozoides se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1,5 h y se seleccionaron mediante centrifugación en gradiente de densidades (Ovipure, Nidacon EVB S.L.). Posteriormente se cocultivaron con los COCs parcialmente desnudados (15 COC/gota de 50  $\mu$ L) en gotas de medio fluido oviductal sintético (SOF) con un 20% de suero de oveja en celo y una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL durante 22 horas en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> y máxima humedad. Finalizada la FIV, los presuntos cigotos se desnudaron con un suave pipeteo y se colocaron en micro gotas de 20  $\mu$ L de medio SOF (6 presuntos cigotos/gota) en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y máxima humedad para su cultivo *in vitro*. A las 48 horas y a los 8 días post-inseminación se evaluó el porcentaje de ovocitos divididos y blastocistos, respectivamente. El análisis estadístico entre tratamientos se llevó a cabo mediante el test de Fisher en el GraphPad Prism v 3 (GraphPad Software, San Diego California USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran en la Tabla 1. El porcentaje de blastocistos producidos con ovocitos BCB- madurados en MC+MT (3,7%) no fue significativamente superior al grupo BCB- madurado en MT (2,3%), aunque se observó un ligero incremento. Ninguno de los medios de maduración estudiados mejoró el porcentaje de blastocistos de los ovocitos BCB- en comparación con los blastocistos obtenidos de los ovocitos BCB+. Los resultados obtenidos en este estudio, demuestran la efectividad de la tinción del BCB para seleccionar los ovocitos más competentes para el desarrollo embrionario *in vitro*, obteniendo un 9% de blastocistos respecto a 2,3% del grupo BCB-. La hipótesis para utilizar un medio de crecimiento (suplementado con ITS y ácido y una concentración de FSH y LH muy baja) era retrasar la meiosis del ovocito para permitirle una síntesis mayor de proteínas, gracias a la Insulina, y que completara la maduración citoplasmática imprescindible para permitir el desarrollo embrionario. En porcino De Wu et al. (2006) observaron un significativo incremento en el desarrollo embrionario de los ovocitos procedentes de folículos pequeños y cultivados en medios de crecimiento. En conclusión, la utilización del BCB permite seleccionar los ovocitos de cordera más competentes para producir embriones *in vitro*. Los ovocitos de hembras prepúberes que aún no han terminado su crecimiento (BCB-) no incrementan significativamente su desarrollo embrionario después de ser suplementados con ITS y AA, como se había observado en porcino.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong, D. T. 2001. *Theriogenology* 55: 1303-1322.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P. 2003 *Theriogenology* 59: 171-188.
- Egerszegi, I., Alm, H., Ratky, J., Heleil, B., Bruessow, K., Torner, H. 2010. *Reprod Fert Dev* 22: 830-838.
- Grazul-Bilska, A.T., Choi, J.T., Weigl, R.M., Kirsch, J.D., Kraft, K.C., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. 2003. *Theriogenology* 59: 1449-1457.
- Ptak, G., Matsukawa, K., Palmieri, C., Della Salda, L., Scapolo, P.A., Loi, P. 2006. *Human Reprod* 21: 2228-2237.
- Pujol, M., Lopez-Bejar, M., Paramio, M.T. 2004. *Theriogenology* 61: 735-744.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P. 2002. *Mol Reprod Dev* 61: 234-248.
- Rodriguez-Gonzalez, E., Lopez-

Bejar, M., Velilla, E., Paramio, M.T. 2002. *Theriogenology* 57: 1397-1409. • Wu, D., Cheung, Q.C., Wen, L., Li, J. 2006. *Biol Reprod* 75: 547-554.

**Tabla 1:** Efecto del medio de crecimiento (MC) sobre el desarrollo embrionario de los ovocitos de corderas seleccionados mediante el test del Brilliant Cresyl Blue (BCB).

Clasificación	Medio de Maduración	n,ovocitos fecundados	Desarrollo embrionario	
			División, n (%)	Blastocistos, n (%)
BCB+	MT	243	166 (68,3)	22 (9,0) <sup>a</sup>
BCB-	MT	216	125 (57,9)	5 (2,3) <sup>b</sup>
BCB-	12 h MC+12 h MT	268	167 (62,3)	10 (3,7) <sup>b</sup>

BCB: brilliant cresyl blue, MT: medio de maduración tradicional; MC: medio de crecimiento. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

#### STUDY OF A GROWTH MEDIUM BEFORE IN VITRO MATURATION OF LOW QUALITY LAMB OOCYTES SELECTED WITH THE BRILLIANT CRESYL BLUE TEST.

**ABSTRACT:** This study analyzed the effect of a growth medium (De Wu et al. 2006) in low quality lamb oocytes on blastocyst yield. Recovered oocytes were exposed for 1 h to 13  $\mu$ M brilliant cresyl blue (BCB) test and classified according to their cytoplasm coloration: BCB+ (blue cytoplasm, grown or high quality oocytes) and BCB- (uncolored, growing or low quality oocytes). Media used: Growth Medium (**GM**: TCM199 with low hormone concentration, 100  $\mu$ g/mL ascorbic acid, 5  $\mu$ L/mL insulin-transferrine-selenium) and Conventional Medium (**CM**: TCM199 with normal hormone concentration and serum). BCB- oocytes were matured in GM for 12 h and then transferred to CM to complete *in vitro* maturation. In turn BCB- and BCB+ oocytes were directly matured for 24 h in CM. *In vitro* fertilization took place in synthetic oviductal fluid (SOF) with 20% of oestrus sheep serum ( $1 \times 10^6$  spz/mL). Presumptive zygotes were cultured for 8 days in SOF. Results showed the effectiveness of the BCB staining in selecting the most competent oocytes for *in vitro* embryo development. Blastocysts obtained with BCB+ was significantly higher (9.0%) compared to BCB- matured in CM (2.3%) or in GM+CM (3.7%). De Wu's (2006) growth medium failed to increase significantly embryo production of lamb oocytes.

**Keywords:** lamb, oocyte quality, brilliant cresyl blue.