

SELECCIÓN DE OÓCITOS DE GATO DOMÉSTICOS UTILIZANDO EL BRILLIANT CREASYL BLUE (BCB) PARA MEJORAR EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

Piras¹, A.R., Ariu¹, F., Pau¹, S., Zedda¹, M.T., Paramio², M.T., Bogliolo¹, L.

¹Departament de Medicina Veterinària, Universidad de Sassari, Sassari. Italia.

²Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. España

Luis@uniss.it

INTRODUCCIÓN

El gato doméstico es un modelo experimental importante para el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida, dirigidas a la conservación de las especies de felinos en peligro de extinción (Pope, 2000; Gomez et al., 2003; Gomez et al., 2004; Lorthongpanich et al., 2004). Sin embargo, en la actualidad, la eficiencia de los sistemas para la producción in vitro de embriones (PIVE), utilizando oocitos madurados in vitro (MIV), sigue siendo insatisfactoria. La calidad de los oocitos es el factor más determinante en el éxito de la PIVE. El variable e imprevisible resultado en la PIVE es debido a la utilización de una población heterogénea de oocitos recogidos de folículos antrales en diferentes fases de crecimiento y atresia. Además, en gata diferentes estudios han mostrado un marcado efecto de la época del año sobre la calidad de los oocitos para ser madurados in vitro (MIV) y desarrollarse hasta blastocistos. Así los resultados de PIVE son mejores en época reproductiva (diciembre hasta junio) que en épocas desfavorables (Spindler y Wildt, 1999; Freistedt et al., 2001; Comizzoli et al., 2003). Actualmente, las técnicas convencionalmente utilizadas para seleccionar los oocitos más competentes para ser utilizados en los protocolos PIVE están basadas en la evaluación morfológica del complejo cumulus-ovocito.

Estudios recientes en diferentes especies animales (Rodríguez-González et al., 2001; Pujol et al., 2004; Alm et al., 2005; Wu et al., 2007; Ishizaki et al., 2009; Wang et al., 2012), han demostrado que el uso de la tinción con el creasyl azul brillante (BCB) para la selección de oocitos permite aumentar el desarrollo embrionario in vitro. El BCB es un colorante vital azul que se reduce por acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) convirtiéndose en un compuesto incoloro. La G6PDH es más activa en los oocitos en fase de crecimiento, que por lo tanto son incoloros después de la tinción con BCB (BCB -) en comparación con los oocitos que ya han alcanzado su crecimiento que tienen un citoplasma con coloración azul. En la actualidad todavía no se utiliza este método para la selección de los oocitos en la especie felina.

Con el fin de mejorar la producción in vitro de embriones durante la temporada no reproductiva, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la prueba del BCB para la selección de oocitos de gata, mediante la evaluación del desarrollo embrionario in vitro después de MIV y FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios se obtuvieron por histerectomía de gatas domesticas de edad comprendida entre los 8 meses y los 2 años durante la temporada no reproductiva (desde julio a noviembre). Los complejos cumulus-oocitos (COCs) se liberaron mediante slicing de los ovarios. Los oocitos clasificados de primer grado (por morfología y tamaño) se distribuyeron aleatoriamente en grupo de control (CTR, n=112) y grupo tratado con el BCB (n=356).

Los COCs se incubaron en BCB 13 µM durante 45 minutos a 38.5°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad. Posteriormente se clasificaron en BCB positivo (citoplasma azul) y BCB negativo (citoplasma incoloro). Los oocitos se maduraron en 650 µL de medio de maduración (TCM 199 suplementado con 0.36mM piruvato, 2mM glutamina, 2.2 mM calcio lactato, 1.2mM cisteína, 4mg/mLBSA y FSH 1 IU/mL yLH 1 IU/mL) durante 24 horas a 38.5°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad. Después de 24 horas de MIV, los oocitos se fecundaron con semen epididimal congelado de gato. Después de la descongelación los espermatozoides se seleccionaron mediante Swim-up. Los oocitos se fecundaron in vitro (FIV) con espermatozoides a una concentración de 5x10⁶ esperm/mL en 450 µL de medio SOF (suplementado con 6 mg/ml BSA, 100 IU/ml penicilina ,50 µg/ml gentamicina) durante

22 horas a 38.5°C en un atmosfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad. Los presuntos cigotos después de lavados y retirados los espermatozoides se cultivaron en 650 µL de medio de cultivo 1 (IVC-1) SOF suplementado con 4 mg/ml BSA, y 100 IU/ml penicilina durante 3 días. Seguidamente los embriones se transfirieron a 650 µL de medio IVC-2, SOF suplementado con 10% suero fetal de ternero (FCS) y 2% de MEM aminoácidos esenciales (EAA) a 38,5°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad durante otros 4 días.

Los resultados de porcentajes de maduración, de división después de la fecundación y el porcentaje de oocitos que alcanzaron el estadio de blastocistos se analizaron con la prueba de chi-cuadrado (STATA/IC 11.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de la tinción con el BCB el 61,8% de los oocitos fue positivo a la tinción (BCB +). No se observaron diferencias estadísticas entre los BCB + y el grupo control en oocitos que alcanzaban la Metafase II después de 24h de MIV, mientras que el porcentaje de oocitos en MII del grupo BCB - (45,6%) fue significativamente menor en comparación con el grupo CTR y el BCB +.

Los porcentajes de división después de la FIV fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en grupo BCB - que en el grupo CTR y el BCB +. Se observó un aumento significativo ($p < 0,05\%$) en la tasa de desarrollo a blastocisto de los oocitos BCB + (20%) en comparación con BCB - (7,3%) y el CTR (10,7%).

Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los descritos en otras especies animales (Rodríguez-González et al., 2001; Pujol et al., 2004; Alm et al., 2005; Wu et al., 2007; Ishizaki et al., 2009; Wang et al., 2012) y muestran que también en la especie felina la tinción con el BCB permite seleccionar los oocitos más competentes.

De hecho, los datos de este estudio mostraron que la doble selección de oocitos por carácter morfológico más la tinción del BCB nos ha permitido aumentar el porcentaje de desarrollo embrionario hasta blastocito en estudios durante la estación no reproductiva, comparados con otros autores. Así, Spindler y Wildt (1999), por primera vez, mostraron el efecto de la época sobre la PIVE con unos porcentajes del 20% de oocitos de gata en MII y sin desarrollo hasta blastocisto en la época no reproductiva. Otros estudios también confirmaron este efecto estacional (Comizzoli et al., 2003) durante la temporada no reproductiva obteniendo un 8% de blastocistos con medio convencional de maduración in vitro. Estos autores también demostraron que el uso de antioxidantes y el aumento de las concentraciones de FSH en los medios MIV incrementaron en esta época del año, los oocitos que llegaron a MII y los que desarrollaron hasta blastocistos (desarrollo 17% a blastocisto).

Los porcentajes de desarrollo embrionario obtenidos en el presente trabajo utilizando los oocitos positivos al BCB son significativamente más altos que los reportados por Spindler y Wildt (1999) y por Comizzoli et al. (2003) utilizando los mismos medios de MIV y los medios MIV enriquecidos con FSH. En conclusión, en base a los datos de nuestro estudio, la selección mediante tinción con BCB antes de la MIV permite aumentar la eficiencia de la producción in vitro de embriones de la especie felina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alm, H., Torner, H., Lohrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I.M., Kanitz, W. 2005. *Theriog.* 63: 2194–2205
- Comizzoli, P., Wildt, D. E., Pukazhenth, B. S. 2003. *Reprod.* 126: 809–816.
- Freistedt, P., Stojkovic, M., Wolf, E. 2001. *Biol. Reprod.* 65: 9–13.
- Gomez, M.C., Jenkins, J.A., Giraldo, A., Harris, R.F., King, A., Dresser, B.L., Pope, C.E. 2003. *Biol. Reprod.* 69: 1032–1041.
- Gomez, M.C., Pope, C.E., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Cole, A., Godke, R.A., Dresser, B.L. 2004. *Clo. Stem Cells* 6: 247–258.
- Ishizaki, C., Watanabe, H., Bhuiyan, M.M.U., Fukui, Y. 2009. *Theriog.* 72: 72–80.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Ketudat- Cairns, M., Likitdecharote, B., Parnpai, R. 2004. *Reprod Fertil Dev.* 16: 149–150.
- Pope, C.E. 2000. *Theriog.* 53: 163-174.
- Pujol, M., Lopez-Bejar, M., Paramio M.T. 2004. *Theriog.* 61 :735–744.
- Spindler, R.E.,

Wildt, D.E. 1999. Biol. Reprod. 61: 188–194. • Wang, L., Lin, J., Huang, J., Wang, J., Zhao, Y., Chen, T. 2012. J. Biomed. Biotechnol. 161372. • Wu, Y.G., Liu, Y., Zhou, P., Lan, G.C., Han, D., Miao, D.Q., Tan J.H., 2007. Cell Research. 17:722-731

Tabla 1. Efecto de la selección mediante BCB en oocitos de gata sobre la maduración nuclear (MII), la división de los oocitos y el desarrollo hasta blastocistos.

Clasificación de oocitos	Total N°.	Oocitos Metafase II N°. (%)	Oocitos Divididos N°. (%)	Blastocistos N°. (%)
BCB +	220	144(65,4%) ^a	63(28,6%) ^a	44(20%) ^a
BCB -	136	62 (45,6%) ^b	15(11,0%) ^b	10(7,3%) ^b
Control	112	67 (59,8%) ^a	32 (28,6%) ^a	12 (10,7%) ^b

Los valores con diferente letra en la misma columna difieren significativamente ($P < 0,05$).

SELECTION OF DOMESTIC CAT OOCYTES USING THE BRILLIANT CREASYL BLUE (BCB) STAINING IMPROVES IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT

ABSTRACT: The brilliant cresyl blue (BCB) test determines the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); the activity of this enzyme is greatest in growing oocytes, but it declines as oocytes grow. This non-invasive test was used in different species to select more competent oocytes. The aim of this study was to evaluate the usefulness of the BCB test selection of more competent domestic cat oocytes in order to improve the in vitro embryo production (IVEP) in non-breeding season. A total of 468 cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered, 112 of them were used as control and 356 COCs were stained with 13mM BCB for 45min. Oocytes with blue coloration of the cytoplasm were classified as BCB + and those without blue cytoplasm coloration were classified as BCB -. After BCB selection oocytes were matured, fertilized and cultured in vitro. The percentages of maturation and cleavage were (65,4%, 28,6%, respectively) for BCB + and (63,0%, 28,6%, respectively) for Control group significantly higher than for BCB - group (45,6%, 11,0%; respectively). Blastocyst rate was significantly higher for BCB + (20%) group compared to control (10,7%) and BCB - (7,3%) groups. In conclusion, the use of BCB allows us to select developmentally competent domestic cat oocytes increasing the *in vitro* embryo production

Keywords: domestic cat, oocytes, BCB, IVEP.