

DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI I EXPRESSIÓ DE P34^{cdc2} EN DIFERENTS GRANDÀRIES D'OÒCITS DE CABRES PREPÚBERS

Begoña Anguita, Ana Jiménez-Macedo, Dolors Izquierdo, Maria Teresa Paramio*

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.
08193 Bellaterra. Tel. 935 811 456. Fax 935811494. Adreça electrònica: teresa.paramio@uab.es.

Resum

L'heterogeneïtat de la població oocitària d'ovaris recollits en escorxadors és molt gran, cosa que fa necessari un procés de selecció molt acurat que ens permeti detectar i seleccionar només aquella que pugui donar lloc a embrions viables. Fins ara, la producció *in vitro* de blastocists a partir d'oòcits de cabres prepúbères havia estat baixa, possiblement perquè els criteris de selecció utilitzats no eren prou eficients. Per tant, es va fer necessari trobar marcadors indicadors de la competència dels oòcits. Com a possible candidat es va analitzar l'expressió de la proteïna p34^{cdc2}, la subunitat catalítica del *maturation promoting factor* (MPF). Aquest complex és el principal regulador de la progressió meiòtica i un candidat a regular la maduració citoplasmàtica. Els resultats que es van obtenir indiquen que, efectivament, la capacitat dels oòcits per a donar lloc a blastocists es relaciona amb la quantitat de p34^{cdc2} detectada, de manera que es podria plantejar el seu ús com a possible marcador molecular de competència per al desenvolupament embrionari.

Paraules clau MPF, p34^{cdc2}, oòcit, cabra.

Abstract

Embryonic development and p34^{cdc2} expression in different sizes of prepubertal goat oocytes Oocytes from ovaries collected at the slaughterhouse present high heterogeneous characteristics, and as a consequence, an accurate oocyte selection is necessary to detect and select only oocytes capables to produce viable embryos. So far, *in vitro* blastocysts production from prepubertal goat oocytes has been low, possibly due to an inefficient oocyte selection. The search of new oocyte competence markers is needed. As a possible marker, we have analysed p34cdc2 protein expression, the catalytic subunit of Maturation Promoting Factor (MPF). This complex is the main meiotic regulator, and it is also thought to be a possible cytoplasmic maturation regulator. The results obtained show that oocyte competence to produce blastocysts is related to p34^{cdc2} protein detected, and therefore, its use as a possible molecular marker of embryonic development could be posed.

Key words MPF, p34cdc2, oocyte, goat.

INTRODUCCIÓ

Els oòcits que s'utilitzen en estudis de maduració *in vitro* (MIV), fecundació *in vitro* (FIV) i cultiu *in vitro* (CIV) són prèviament seleccionats per utilitzar només aquells que siguin capaços de donar lloc a embrions viables. Aquesta selecció se sol realitzar seguint criteris basats en la morfologia dels complexos cúmulus-oòcits (COC), de manera que només se seleccionen aquells que presenten citoplasma homogeni, estan envoltats per diverses capes de cèl·lules de cúmulus i, a més, tenen una mida gran. Tanmateix, el

percentatge de blastocists que s'ha aconseguit a partir d'oòcits de cabres prepúbères seleccionats seguint aquests criteris ha estat baix.

Els oòcits que s'utilitzen al nostre laboratori per a la MIV, FIV i CIV provenen d'ovaris recollits a l'escorxador. Això implica que la població oocitària que es recuperi d'aquests ovaris és molt heterogènia, i hi podem trobar diferents graus de desenvolupament i d'atrèsia. Per tant, és possible que criteris de selecció únicament basats en característiques morfològiques no siguin prou eficients per a seleccionar només els oòcits

Taula 1 Estadi nuclear de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers en el moment de ser alliberats dels fol·licles.

Diàmetre	N	GV	GVBD	MI	A-T	MII	DEG
< 110 µm	75	62 a (82,66)	4 a (5,33)	2 (2,66)	0 (0)	0 (0)	7 a,b (9,33)
110-125 µm	105	51 b (48,57)	28 b (26,66)	5 (4,76)	0 (0)	0 (0)	21 a (20)
125-135 µm	250	34 c (13,6)	161 c (64,4)	20 (8)	1 (0,4)	4 (1,6)	30 a,b (12)
> 135 µm	198	3 d (1,51)	159 d (80,3)	15 (7,57)	0 (0)	4 (2,02)	17 b (8,58)

Taula 2 Estadi nuclear de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers després de la MIV.

Diàmetre	N	GV	GVBD	MI	A-T	MII	DEG
< 110 µm	40	38 a (95)	1 a,b (25)	0 a (0)	0 (0)	0 a (0)	1 (2,5)
110-125 µm	145	38 b (26,21)	11 a (7,58)	64 b (44,14)	0 (0)	30 b (20,69)	2 (1,38)
125-135 µm	326	3 c (0,92)	8 b (2,45)	124 b (28,03)	0 (0)	189 c (57,97)	3 (0,92)
> 135 µm	91	0 c (0)	1 b (1,1)	17 c (18,68)	1 (1,1)	71 d (78,02)	1 (1,1)

Taula 3 Estadi pronuclear de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers a les disset hores després de la FIV.

Diàmetre	N	No fec.	Fecundats			DEG
			1 PN	2 PN	POLISP	
< 110 µm	24	24 a (100)	0 (0)	0 a (0)	0 a (0)	0 (0)
110-125 µm	59	31 b (52,54)	2 (3,39)	17 b (28,81)	7 a,b (11,86)	2 (3,39)
125-135 µm	95	38 b,c (40)	2 (2,10)	33 b (34,74)	18 b (18,95)	2 (2,10)
> 135 µm	82	26 c (31,71)	3 (3,66)	34 b (41,46)	16 b (19,51)	3 (3,66)

Taula 4 Desenvolupament embrionari de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers.

Diàmetre	n	Total DIV	Dividits				DEG
			2-7 cèl.	8-16 cèl.	Mòrules	Blastocists	
< 110 µm	30	0 a (0)	0 a (0)	0 (0)	0 (0)	0 a (0)	9 a (30)
110-125 µm	74	12 b (16,21)	10 a (13,51)	2 (2,70)	0 (0)	0 a (0)	29 a (39,19)
125-135 µm	154	61 c (40,13)	54 b (35,06)	3 (1,95)	1 (0,65)	3 a (1,95)	41 a (26,62)
> 135 µm	72	44 d (61,11)	31 b (43,05)	2 (2,78)	2 (2,78)	9 b (12,5)	10 b (13,89)

competents, i s'haurien de trobar altres marcadors de competència oocitària.

S'ha especulat que la incompetència oocitària pugui donar-se per una incompleta maduració nuclear o citoplasmàtica. El principal regulador de la maduració nuclear és el *maturation promoting factor* (MPF), complex format per una subunitat catalítica (p34^{cdc2}) i una subunitat reguladora (ciclina B1) (Labbé *et al.*, 1989). És necessària la unió d'aquestes dues subunitats i la fosforilació dels residus Thr 161, Thr 14 i Tyr 15 perquè el complex pugui activar-se. Aquesta activació només es donarà quan es produeixi la desfosforilació dels residus Thr 14 i Tyr 15 (Gautier *et al.*, 1991), procés catalitzat per la Cdc25 fosfatasa. L'activació del complex MPF donarà lloc a la represa de la meiosi en els oòcits. Per altra banda, el MPF també es considera un possible regulador de la maduració citoplasmàtica oocitària (Naito *et al.*, 1992).

La incompetència de l'oòcit pot estar relacionat

amb una deficiència en la síntesi o activació del complex MPF o alguna de les seves subunitats. D'aquesta manera, s'ha relacionat l'adquisició de competència meiótica amb la síntesi de p34^{cdc2} en ratolins (Chesnel i Eppig, 1995) i cabres adultes (Dedieu *et al.*, 1998). En canvi, la ciclina B1 es considera el factor responsable de la represa de la meiosi en vaques (Dedieu *et al.*, 1998) i truges (Sun *et al.*, 2001).

La nostra hipòtesi de treball és que la falta de competència en els oòcits de cabres prepúbbers es podria explicar per una falta en la síntesi de la subunitat catalítica del MPF, la p34^{cdc2}. Per tant, el nostre objectiu va ser l'estudi de l'expressió de la p34^{cdc2} i la capacitat per al desenvolupament embrionari de diferents grandàries d'oòcits, per estudiar la possibilitat de fer servir aquesta expressió com a indicador molecular de la competència oocitària.

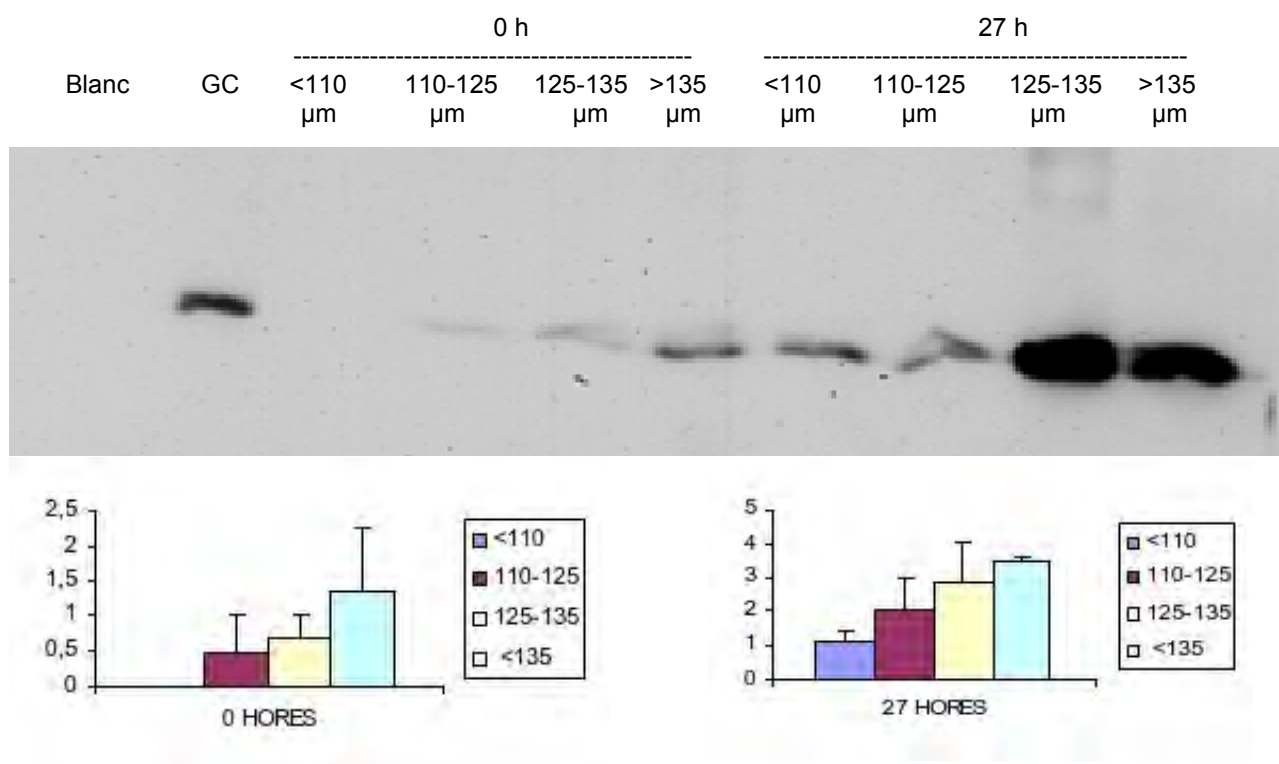


Figura 1 Expressió de la proteïna p34^{cdc2} en diferents mides d'oòcits de cabres prepúbères en el moment d'alliberament dels fol·licles i després de la MIV.

MATERIAL I MÈTODES

Els ovaris van ser recollits en un escorxadador comercial, i van ser transportats al laboratori en PBS a 38,5° C en un temps màxim de dues hores. Els COC van ser alliberats dels fol·licles mitjançant *slicing*. Una part d'aquests COC van ser denudats en el moment de la recollecció, mesurats i es van classificar en grups segons el seu diàmetre: < 110 μm, 110-125 μm, 125-135 μm, > 135 μm. La resta de COC es van utilitzar per a la MIV, amb medi TCM199 suplementat amb hormones, 400 μM de cisteamina i 10% de sèrum boví. La MIV es va dur a terme en una atmosfera amb un 5% de CO₂ en aire i a 38,5° C durant vint-i-set hores. Després d'aquest període, una part dels COC madurats també van ser denudats i classificats en els grups de grandària abans especificats. La resta es van utilitzar per a la FIV.

Per a la FIV es va utilitzar semen fresc de mascles de fertilitat provada. Els espermatozoides mòbils es van seleccionar mitjançant *swim-up* durant una hora, i després es van capacitar amb 200 nM de ionomicina + 10 μg/ml d'heparina. El cocultiu d'oòcits i espermatozoides es va realitzar durant vint-i-quatre hores en unes condicions del 5% CO₂ en aire i 38,5° C. Després d'aquest període, els presumptes zigots es van

cultivar en medi SOF durant set dies més. El desenvolupament embrionari es va avaluar mitjançant tinció amb Hoechst.

Una part dels oòcits classificats per diàmetres en el moment de la recollecció i després de la MIV es van congelar en N₂ líquid i van ser emmagatzemats a -80° C, fins a la seva utilització per a l'extracció de proteïnes i posterior detecció de la proteïna p34^{cdc2} mitjançant *Western blot*.

L'extracció de proteïnes es va realitzar amb TriReagent® (T-9424, Sigma), seguint les instruccions del producte. El *pellet* de proteïnes corresponent a vint oòcits va ser resuspès en SDS 1%, i va ser utilitzat per a realitzar el *Western blot*. Breument, es va realitzar l'electroforesi de les proteïnes corresponent a vint oòcits en un gel d'acrilamida 10% a 25 mA constants. La transferència de les proteïnes a la membrana de nitrocellulosa es va realitzar durant una hora a unes condicions de 100 V constants. Després de la transferència, la membrana va ser bloquejada amb TBS+ 0,05 Tween20 + 1% de llet desnatada durant tota la nit. Es va incubar amb anticòs primari durant una hora. La incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar durant trenta minuts. La detecció de la proteïna es va realitzar amb l'ECL-Plus Western Blotting Detection Kit (RPN2132, Amersham Biosciences).

El programa estadístic utilitzat per a l'anàlisi dels resultats va ser el GraphPad InStat 3.01 (Graph-Pad software). El test de Fisher va ser utilitzat per a determinar les diferències en els resultats de MIV, FIV i CIV dels diferents grups de diàmetres d'oòcits. Els resultats de l'expressió de proteïna p34^{cdc2} mitjançant *Western blot* van ser analitzats mitjançant el test ANOVA. Per a cada grandària, cada experiment va ser realitzat un mínim de tres vegades. Tots els valors amb valors amb una $P < 0,05$ es van considerar estadísticament significatius.

RESULTATS

La taula 1 mostra l'estadi nuclear dels diferents grups d'oòcits segons la seva grandària en el moment de ser alliberats del fol·licle. Es pot observar que la mida del diàmetre és més gran, el percentatge d'oòcits que han reprès la meiosi és significativament major (GV: $< 110 \mu\text{m}$: 82,66 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 48,57 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 13,6 %; $> 135 \mu\text{m}$: 1,51 %).

L'estadi nuclear en què es trobaven els oòcits després de la MIV es representa a la taula 2. Hi podem observar que la capacitat dels oòcits per a arribar a l'estadi de metafase II (MII) es relaciona amb la seva grandària ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 20,69 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 57,97 %; $> 135 \mu\text{m}$: 78,02 %).

La taula 3 reflecteix l'estadi pronuclear dels zigots a les disset hores de la FIV. Podem observar que el percentatge d'oòcits fecundats també augmenta amb la grandària de l'oòcit ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 47,46 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 60 %; $> 135 \mu\text{m}$: 68,29 %). Tanmateix, aquestes diferències en el nombre de fecundats totals no es reflecteixen estadísticament en el nombre de fecundats normals (2PN) si comparem els tres grups de major grandària, encara que sí que podem apreciar una tendència a augmentar a mesura que augmenta la grandària dels oòcits ($110\text{-}125 \mu\text{m}$: 28,81 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 34,74 %; $> 135 \mu\text{m}$: 41,46 %).

La taula 4 mostra el nombre de cèl·lules dels embrions després de set dies de cultiu *in vitro* segons la seva grandària. El nombre d'embrions totals que hi trobem també es relaciona amb el diàmetre dels oòcits ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 16,21 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 40,13 %; $> 135 \mu\text{m}$: 61,11 %). A més, es pot apreciar que el nombre de blastocists obtinguts és significativament superior en els oòcits de major grandària respecte als altres tres grups ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 0 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 1,95 %; $> 135 \mu\text{m}$: 12,5 %).

La figura 1 representa els resultats obtinguts en la detecció de la proteïna p34^{cdc2} mitjançant *Western blot*. Hi podem observar una tendència que la quantitat de proteïna detectada sigui més gran a mesura

que el diàmetre de l'oòcit també ho és en el moment d'alliberar-los dels fol·licles, encara que no és significativa ($< 110 \mu\text{m}$: 0; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: $0,47 \pm 0,54$; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: $0,69 \pm 0,33$; $> 135 \mu\text{m}$: $1,35 \pm 0,90$). Després de la maduració, observem un augment de la quantitat de p34^{cdc2} relacionat amb la mida dels oòcits ($< 110 \mu\text{m}$: $1,15 \pm 0,24$; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: $2,02 \pm 0,94$; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: $2,81 \pm 1,21$; $> 135 \mu\text{m}$: $3,43 \pm 0,18$).

DISCUSSIÓ

La capacitat d'un oòcit per a completar tant la maduració nuclear com la citoplasmàtica està directament relacionada amb el seu diàmetre, com hem pogut observar en els resultats de MIV, FIV i CIV. Aquesta relació s'ha establert també en altres espècies, en les quals es va relacionar la grandària dels fol·licles i, en conseqüència, la grandària d'un oòcit, amb la seva capacitat per a madurar (ratolí, Sorensen i Wassarman, 1976; rata, Bar Ami i Tsafiriri, 1981; truja, Motlik *et al.*, 1984; ovella, Moor i Gandolfi, 1987; vaca, Furher *et al.*, 1989; cabra, Martino *et al.*, 1994). El percentatge de blastocists obtinguts en cabres prepúbères ens ha permès observar, en el nostre cas, que ens interessa seleccionar aquells oòcits que presenten un diàmetre igual o superior a $135 \mu\text{m}$.

Hem trobat una clara relació entre la capacitat d'un oòcit per a mantenir el desenvolupament embrionari i la quantitat de proteïna p34^{cdc2} que expressa. Aquesta relació s'ha trobat tant en el moment d'alliberament dels oòcits dels seus fol·licles com després de la MIV. Això confirmaria, per tant, la hipòtesi que el MPF té un paper important en la maduració citoplasmàtica, a més de la maduració nuclear. Tanmateix, seria necessari realitzar un estudi de l'activitat del complex per veure si l'augment de proteïna p34^{cdc2} detectat en els oòcits de diàmetre més gran també es correspon amb un augment d'activitat del complex en aquests oòcits.

Per altra banda, s'ha observat que els oòcits més grans ja havien reprès la meiosi en el moment de la recollecció. Aquesta situació ens podria indicar que aquests oòcits provenen de fol·licles que han iniciat un procés d'atrèsia. Tanmateix, sembla que aquesta situació no afecta la capacitat d'aquests oòcits per a donar lloc a blastocists. De fet, Hendriksen *et al.* (2000) van suggerir que una situació moderada d'atrèsia en els fol·licles podria mantenir o induir en l'oòcit canvis similars a la premaduració que té lloc en el desenvolupament preovulatori *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- CHESNEL, F.; EPPIG, J. J. (1995). «Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis». *Mol. Reprod. Dev.*, 40:503-508.
- DEDIEU, T.; GALL, L.; HUE, E.; LEDAN, E.; CROZET, N.; RUFFINI, S.; SEVELLEC, C. (1998). «p34 cdc2 expression and meiotic competence in growing goat oocytes». *Mol. Reprod. Dev.*, 50:251-262.
- GAUTIER, J.; SOLOMON, M. J.; BOOHER, R. N.; BAZAN, J. F.; KIRSCHNER, M. J. (1991). «Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activate p34cdc2». *Cell*, 67:197-211.
- LABBÉ, J. C.; PICARD, A.; PEAUCELLIER, G.; CAVADORE, J. C.; NURSE, P.; DORÉE, M. (1989). «Purification of MPF from starfish: Identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation». *Cell*, 57:253-263.
- NAITO, K.; DAEN, F. P.; TOYODA, Y. (1992). «Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of porcine oocytes matured in different media *in vitro*». *Biol. Reprod.*, 47:43-47.
- SUN, Q. Y.; LAI, L.; BONK, A.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. (2001). «Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: Effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition». *Mol. Reprod. Dev.*, 59:192-198.
- SORENSEN, R. A.; WASSARMAN, P. M. (1976). «Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte». *Dev. Biol.*, 50:531-536.
- BAR AMI, S.; TSAFRIRI, A. (1981). «Acquisition of meiotic competence in the rat: Role of gonadotropin and estrogen». *Gamete. Res.*, 4:463-472.
- MOTLIK, J.; CROZET, N.; FULKA, J. (1984). «Meiotic competence of pig oocytes isolated from early antral follicles». *J. Reprod. Fertil.*, 72:323-328.
- MOOR, R. M.; GANDOLFI, F. (1987). «Molecular and cellular changes associated with maturation and early development in early sheep eggs». *J. Reprod. Fertil.*, 34:55-69.
- FURHER, F.; MATR, B.; SCHELLANDER, K.; KALAT, M.; SCHLEGER, W. (1989). «Maturation competence and chromatin behaviour in growing and fully grown cattle oocytes». *J. Vet. Med.*, 36:285-291.
- MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. (1994). «Meiotic competence of prepubertal goat oocytes». *Theriogenology*, 41:969-980.
- HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS PLAM, STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. (2000). «Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes». *Theriogenology*, 53:11-20.