

SELECCIÓN DE OVOCITOS BOVINOS MEDIANTE TINCIÓN CON BRILLIANT CRESYL BLUE (BCB) PARA DESARROLLO HASTA BLASTOCISTO TRAS ACTIVACIÓN PARTENOGENÉTICA

Cornelia Milovanov,¹ Anna Veiga,² Begoña Aran,² Rita Vassena² y Juan Carlos Izpisua^{1,3}

¹ Centre de Medicina Regenerativa, Barcelona.
cmilovanov@cmrb.eu.

² Banc de Cèl·lules Mare, Centre de Medicina Regenerativa, Barcelona.

³ The Salk Institute for Biomedical Studies, La Jolla, EEUU.

Resumen

El objetivo de este estudio es determinar si la tinción Brilliant Cresyl Blue (BCB) es útil para la selección de ovocitos bovinos previa a la maduración *in vitro* (IVM) y a la activación partenogenética. Para ello, los ovocitos fueron seleccionados según su actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) mediante la tinción con BCB antes de madurarlos *in vitro*. Se postula que los ovocitos en maduración presentan niveles más altos de G6PDH que los ovocitos ya maduros. Nuestros resultados demuestran que la tinción de COC con BCB antes de la IVM puede ser útil para la selección de ovocitos competentes para la activación partenogenética. Además, la actividad G6PDH podría ser un marcador útil para determinar la calidad ovocitaria posterior. La clasificación de los COC bovinos mediante tinción con BCB (o actividad G6PDH) podría utilizarse para una mejor selección antes de realizar activación partenogenética, fecundación *in vitro* (FIV) o transferencia nuclear interespecífica (SCNT).

Palabras clave: BCB, partenogénesis, ionoforo A23187, 6-DMAP.

Abstract

The objective of this study was to determine if Brilliant Cresyl Blue staining (BCB) can be used to select oocytes for *in vitro* maturation (IVM), and parthenogenetic activation. For this purpose, prior to IVM oocytes were selected for developmental competence on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity indicated by Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining. It has been hypothesized that growing oocytes have a higher level of active G6PDH in comparison to the mature oocytes. Our results show that the staining of bovine cumulus-oocytes complexes with BCB before IVM can be used to select developmentally competent oocytes for parthenogenetic activation. In addition, G6PDH activity could also prove to be a useful marker for determining oocyte quality in the future. The classification of bovine cumulus-oocyte complexes on the basis of BCB staining (or G6PDH activity) could be effectively used to select bovine oocytes in terms of their further developmental competence for, IVF and interspecies SCNT protocol.

Key words: BCB, G6PDH, parthenogenesis, ionophore A23187, 6-DMAP.

INTRODUCCIÓN

La competencia de desarrollo ovocitario se define como la capacidad de un ovocito de finalizar la meiosis, de dividirse tras la fecundación, alcanzar el estadio de blastocisto y conseguir un embarazo que llegue a término con descendencia sana (Sirard *et al.*, 2006). Esta capacidad se adquiere gradualmente durante la foliculogénesis mientras el ovocito crece y las células somáticas que lo acompañan se diferencian (Eppig *et al.*, 1994). Se ha demostrado que muchos factores afectan al potencial de desarrollo del

ovocito, incluyendo el tamaño y la calidad del folículo (Blondin y Sirard, 1995), la estimulación hormonal (Blondin *et al.*, 2002), el medio de maduración (Warzych *et al.*, 2007), la edad (Rizos *et al.*, 2005), etc. Los criterios morfológicos basados en grosor y compactación del cúmulo y la homogeneidad del ooplasma se han utilizado frecuentemente y son una manera práctica de evaluar la calidad ovocitaria. Sin embargo, la valoración morfológica es insuficiente para seleccionar los ovocitos capaces de dar lugar a un embarazo a término (Loneragan *et al.*, 2003). La tinción con BCB ha sido utilizada en di-

Cuadro 1. Efecto de la selección ovocitaria de la actividad G6PDH mediante tinción BCB en la IVM y desarrollo embrionario tras activación partenogenética

	Nº ovocitos	MII (%)	División (%)	Blastocistos (%)
Control	208	150/208 (72)	90/150 (60)	21/90 (23)
BCB+*	129	98/129 (76)	64/98 (65)	23/64 (36)
BCB-**	107	55/107 (51)	20/55 (36)	1/20 (5)

* $P < 0,3$. ** $P = 0,1$

versas especies, incluyendo el cerdo (Wongsrikeao *et al.*, 2006), la cabra (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2002) y el bovino (Bhojwani *et al.*, 2007). Los ovocitos inmaduros sintetizan una serie de proteínas como la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH). Los ovocitos inmaduros presentan niveles altos de G6PDH en comparación con los ovocitos maduros. El test de BCB, que mide la actividad G6PDH, está basado en la capacidad de la G6PDH en convertir la tinción azul del BCB a incolora (Ericsson *et al.*, 1993). El objetivo de este estudio es determinar si el BCB puede ser útil para seleccionar ovocitos bovinos competentes antes de la maduración IVM y el desarrollo a blastocisto tras la activación partenogenética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recuperación de ovocitos y tinción con BCB

Los ovocitos fueron aspirados a partir de ovarios proporcionados por un matadero y fueron teñidos con BCB. El método de tinción con BCB ha sido ya descrito en estudios anteriores (Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007). Los COC fueron sometidos a una solución de 26 μ M de BCB (B-5388, Sigma-

Alderich) diluida en mDPBSs durante 90 min a 38,5 °C en atmósfera húmeda. Tras su lavado, los COC teñidos fueron examinados bajo el estereomicroscopio y clasificados en tres grupos: un grupo control y dos grupos según la coloración del citoplasma: ovocitos con coloración azul (BCB+) y ovocitos sin coloración azul (BCB-). Se evaluó la capacidad de desarrollo de los ovocitos de cada grupo, tras IVM, activación partenogenética y cultivo *in vitro* (IVC).

Maduración in vitro (IVM)

Los COC fueron lavados dos veces en medio de maduración (TCM-199) suplementado con suero fetal bovino inactivado y 10 μ g/ml de hormona foliculoestimulante (Ovagen, Auckland, ICP, Nueva Zelanda) (*v/v*) al 20 %. Seguidamente fueron incubados con medio de maduración durante 24 h a 38,5 °C y 5 % CO₂.

Activación y cultivo in vitro de los embriones

Tras la IVM, las células del cúmulo fueron eliminadas con hialuronidasa al 0,1 % en PBS (*phosphate buffered saline*) sin calcio, a 38,5 °C durante 5 min y mecánicamente mediante una pipeta durante 3-

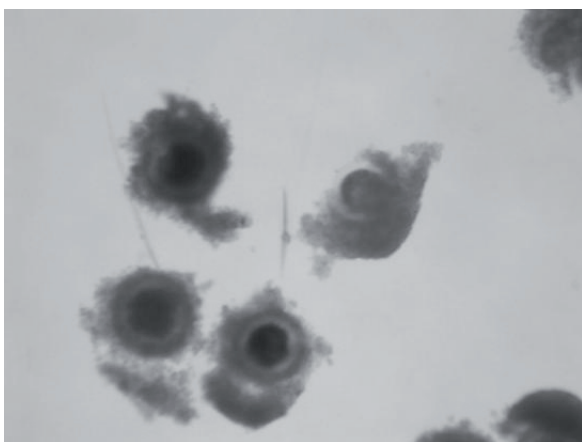


Figura 1. Tinción diferencial de COC tras exposición a BCB

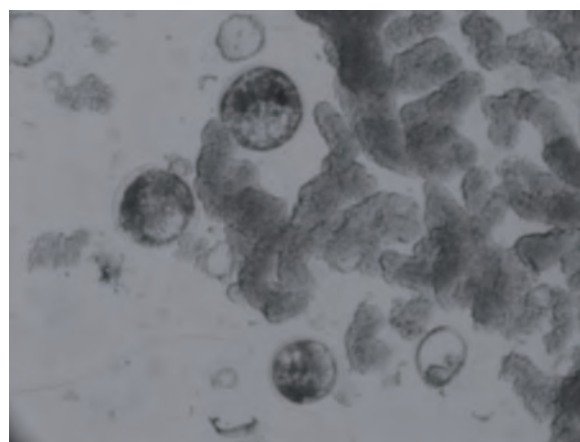


Figura 2. Blastocistos bovinos en día 8 de desarrollo procedentes de ovocitos activados mediante CI y 6-DMAP.

5 min. Únicamente los ovocitos con corpúsculo polar visible fueron activados mediante incubación en ionóforo de calcio A23187 (10 μ M durante 5 min) y 6-DMAP (2 mM durante 3 h). Tras la activación, los ovocitos fueron lavados tres veces y transferidos a medio Menezos B2 (Laboratoire CCD, París, Francia) y co-cultivados sobre una monocapa de células epiteliales de oviducto bovino (BOEC) bajo aceite. Fueron cultivados durante siete días para evaluar la tasa de blastocisto y el desarrollo partenogenético.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron recuperados y utilizados para el estudio un total de 605 COC bovinos. Ciento sesenta y uno se usaron para evaluar la configuración meiótica tras IVM y 444 para la IVM, activación partenogenética y posterior desarrollo: 208 se usaron para el grupo control, mientras que 236 fueron teñidos con BCB, de los cuales 129 (54,6 %) resultaron BCB+ y 107 (45,4 %) fueron BCB- y seleccionados para la activación partenogenética. Tras 24 h de IVM, no hubo diferencias significativas en la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII entre el grupo control y el grupo BCB+ (72 % y 76 %, respectivamente), pero este porcentaje fue significativamente menor en el grupo BCB- (51 %). También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la tasa de blastocisto alcanzada en el octavo día tras la activación partenogenética. La tasa de blastocisto alcanzada en el grupo BCB+ fue significativamente mayor (36 %) que en los otros grupos. La tasa de blastocisto en el grupo control fue significativamente mayor que en el grupo BCB (23 % y 5 %, respectivamente). Los blastocistos presentaron una morfología normal en todos los tratamientos.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la tinción de COC bovinos con BCB tras IVM es efectiva para seleccionar los ovocitos competentes para la activación partenogenética. Además, la actividad G6PDH podría ser un marcador útil para determinar la calidad ovocitaria posterior. La clasificación de los COC bovinos mediante tinción con BCB (o actividad G6PDH) podría utilizarse para seleccionar los ovocitos bovinos para realizar activación partenogenética, fecundación *in vitro* (FIV) o transferencia nuclear interespecífica (SCNT).

BIBLIOGRAFÍA

- BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. (2007). «Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer». *Theriogenology*, 67: 341-354.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. (2002). «Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes». *Biology of Reproduction*, 66: 38-43.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. (1995). «Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes». *Molecular Reproduction and Development*, 41: 54-62.
- EPPIG, J. J.; SCHULTZ, R. M.; O'BRIEN, M.; CHESNEL, F. (1994). «Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes». *Developmental Biology*, 164: 1-9.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. (2003). «Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns». *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 259-267.
- RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARELL, K. J.; MACSIURTAIN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. (2005). «Comparisons between nulliparous heifers and cow as oocyte donors for embryo production *in vitro*». *Theriogenology*, 63: 939-949.
- RODRIGUEZ-GONZALES, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VELLILLA, E.; PARAMIO, M. T. (2002). «Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test». *Theriogenology*, 57: 1397-1409.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. (2006). «Contribution of the oocyte to embryo quality». *Theriogenology*, 65: 126-136.
- WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; SZYDLOWSKI, M.; LECHNIAK, D. (2007). «Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes». *Animal Reproduction Science*, 97: 334-343.
- WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; YAMASAKI, H.; AGUNG, B.; TANIGUCHI, M.; NAOI, H.; SHIMIZU, R.; NAGAI, T. (2006). «Effect of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the section of porcine oocytes for *in vitro* production of embryos». *Theriogenology*, 66: 366-372.