

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE OVOCITOS DE CORDERA SELECCIONADOS MEDIANTE EL TEST DEL BCB (AZUL DE CRESOL BRILLANTE)

Catalá María, Morato Roser, Romaguera Roser, Izquierdo Dolors, Paramio M Teresa
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona. Email: Teresa.Paramio@uab.es.

INTRODUCCIÓN

El test del azul de cresol brillante (BCB) es una técnica capaz de seleccionar los ovocitos que han finalizado su crecimiento y que hipotéticamente son más competentes para llegar al estadio de blastocisto. El BCB es una tinción vital que determina la actividad intracelular de la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Spikings y col., 2007). La G6PDH se sintetiza dentro del ovocito durante la fase de crecimiento, disminuyendo su actividad al completar la misma. De esta manera, si la G6PDH se encuentra activa en el ovocito, reducirá el colorante BCB a una tonalidad más clara (ovocitos incoloros). En el caso que el ovocito haya completado su crecimiento, la G6PDH se encontrará con baja actividad, siendo incapaz de reducir el colorante (ovocitos de color azul).

Las mitocondrias son capaces de generar ATP en grandes cantidades, regular la homeostasis intracelular del calcio y la apoptosis (Berridge y col., 1998, Duchen 2000). Una buena distribución de las mismas es importante para completar funciones específicas de las células. A su vez, la distribución de las mitocondrias activas puede ser un indicador de la energía requerida en procesos importantes en lo que respecta a la maduración, fecundación y desarrollo embrionario (Schatten H. y col., 2005). De esta manera, la distribución y actividad mitocondrial podrían ser un criterio interesante para determinar la maduración citoplasmática y por lo tanto, la competencia ovocitaria.

Las tinciones con Mitotracker (Poot y col., 1996) son tinciones específicas para el marcaje de mitocondrias. Existen distintos tipos de Mitotracker, utilizándose el Mitotracker Green FM para marcar las mitocondrias totales y el Mitotracker Orange CMTMRos para marcar únicamente las mitocondrias activas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad de los ovocitos ovinos mediante su selección con el colorante BCB y valorar su actividad mitocondrial mediante la tinción con Mitotracker Orange CMTMRos (M.7510 Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos se recuperaron mediante la técnica de *slicing* de ovarios de ovejas de 3 a 6 meses de edad. Se seleccionaron los ovocitos con 3 o más capas de células del cúmulo (COCs) y citoplasma homogéneo.

Los COCs, se incubaron en una solución de 26 μ 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:

BCB+: ovocitos con citoplasma azul. Aquellos ovocitos que tienen una baja actividad enzimática de la G6PD y que son incapaces de degradar el colorante. Hipotéticamente, ovocitos que han finalizado su crecimiento.

BCB -: ovocitos sin coloración azul. Aquellos ovocitos con una alta actividad de la G6PD capaz de degradar el BCB. Hipotéticamente, ovocitos en fase de crecimiento.

A su vez, se midió el diámetro de los ovocitos BCB+ y BCB- y de un grupo control el cual no fue sometido a la tinción con BCB. Para ello, los ovocitos se desnudaron mediante un

suave pipeteo y se procedió a su medición usando una lupa estereoscópica a 96 X (Olympus SZH). El diámetro ovocitario se midió incluyendo la zona pelúcida.

La maduración *in vitro* (MIV) se llevó a cabo adaptando los protocolos de Ptak y col. (2006) y Grazul-Bilska y col. (2003). Los COCs fueron colocados en placas de 4 pocillos con 500 μ l de medio de maduración (TCM199 suplementado con 5 μ g/ml FSH, 5 μ g/ml LH, 1 μ g/ml E₂, 10 ng/ml EGF, 100 μ M cisteamina, 0,2 mM Piruvato sódico, 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco®) y 10% SFB) cubiertos con 200 μ l de aceite mineral durante 24 h a 38,5 °C, en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire y máxima humedad.

Para la tinción de las mitocondrias de los ovocitos BCB+, BCB- y control, se tomaron muestras de los COCs a las 0 y a las 24 horas post maduración. Los ovocitos fueron denudados e incubados a 38°C durante 30 min en una solución de PBS con 200 nM de Mitotracker Orange CMTMRos. Posteriormente se procedió a fijarlos en una solución de paraformaldehído al 3 % durante 30 - 60 min a 38°C. Transcurrido ese tiempo, los ovocitos se lavaron repetidamente en medio PBS y se montaron en grupos de 10 sobre un porta-objeto tratado previamente con poli-L-lysina. Finalmente, para la observación del estadio nuclear, las muestras se incubaron con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride) y se cubrieron con un cubre-objetos, manteniéndose en congelador hasta su posterior análisis. Durante toda la tinción se trabajó en oscuridad.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en un microscopio de escaneo láser confocal (Leica TCS-SP2-AOBS) con software especializado. Se utilizó una excitación de 554 nm para el mitotracker Orange y 405 nm para el DAPI. Las muestras se analizaron según el grado de intensidad de las marcas de mitotracker. Para ello se tomó como referencia el plano medio de los ovocitos y, manteniendo los parámetros iguales en todos los casos, las muestras se procesaron utilizando el software del microscopio. Se creó un patrón de intensidad del 0 a 3, considerando 0 a la ausencia total de marcas y 3 a la observación de un gran número de marcas. Se tuvo en cuenta el valor de la energía media que proporcionó el software.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 1211 ovocitos que se tiñeron con el test de BCB, 368 (30%) fueron BCB+ y 843 (70%) BCB-. Estos porcentajes son similares a los obtenidos por Rodríguez-González y col. (2002) en cabras. Sin embargo, tanto en cerdos (Roca y col., 1998) como en bovinos (Pujol y col., 2004) se han encontrado un mayor porcentaje de ovocitos BCB+. Respecto al diámetro de los ovocitos, el grupo de ovocitos BCB+ presentó un diámetro significativamente mayor que los BCB- y el grupo control (121,42 μ m, 116,51 μ m y 119,8 μ m, respectivamente).

La *tabla 1* muestra los diferentes niveles de intensidad de las mitocondrias según su clasificación con el BCB. A las 0 horas se obtuvo un 100 % de ovocitos BCB+ con intensidad tipo 2, mientras que en los BCB- solo se obtuvo un 33%. Tras la MIV, no hemos observado diferencias entre los grupos BCB+ y BCB- con intensidad del tipo 2 pero podemos observar la aparición de la intensidad de tipo 3 con un 33% y 10,5%, respectivamente, demostrando un aumento importante de la actividad mitocondrial en los ovocitos maduros. A su vez, tras la maduración, hemos obtenido un 21% de ovocitos BCB- con intensidad del tipo 0, mostrando la efectividad de la tinción a la hora de descartar los ovocitos de menor calidad. Al igual que en equinos (Torner y col., 2007), cerdos (Torner y col., 2004) y bovinos (Tarazona y col., 2006), hemos encontrado un aumento significativo en los patrones de intensidad mitocondrial en ovocitos que han alcanzado el estadio de Metafase II. Este resultado se justifica con lo estudiado por Brevini y col. (2005) que observaron que a medida que el ovocito alcanzaba el estadio madurativo adecuado, el contenido de ATP intracelular aumentaba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brevini T.A., Vassena R, Francisci C, Gandolfi F, 2005. *Biol Reprod* 72, 1218–1223
- Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. 1998 *Nature* 395, 645–648
- Duchen M.R., 2000 *Cell Calcium* (2000) 28(5/6), 339–348
- Grazul-Bilska A.T., Choi J.T., Bilski J.J., 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 Reproduction* 21(9):2228–2237
- Poot M., Zhang Y., Krämer J., Wells S., Jones L.J., Hanzel D.K., Lugade A.G., Singer V.L., Haugland R.P. 1996. *J. of Histochem. and Cytochem.* 44(12):1363–1372.
- Pujol M, Lopez-Bejar M, Paramio M-T. *Therio.* 2004;61:735–44.
- Roca J, Martinez E, Vazquez JM, Lucas X. *Reprod Fert Dev* 1998;10:479–85
- Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Béjar M, Vellilla E, Paramio MT. *Therio.* 2002;57:1397–409.
- Schatten H., Prather R.S., Sun Q. *Mitoch.* 5, 303–321.
- Spikings E.C., Alderson J., St. John J. 2007. *Dev. Biol Reprod, (Gamete Biol.)* 76:327–335.
- Tarazona A.M, Rodriguez J.I, Restrepo L.F, Oliveira-Angel M, 2006. *Reprod Domest Anim* 41, 5–11
- Torner H., Alm H., Kanitz W., Goellnitz K., Becker F., Poehland R., Brüssow K.P., Tuchscherer A. 2007. *Reprod Dom Anim* 42, 176–183.
- Torner H, Brüssow K.P, Alm H, Ratky J, Poehland R, Tuchscherer A, Kanitz W, 2004: *Theriogenology* 61, 1675–1689.

Tabla 1 Actividad mitocondrial valorada según patrones de intensidad

	MIV (hs)	n	Intensidad de mitocondrias			
			0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
	0 horas					
BCB+		8			8 (100) ^a	
BCB-		6		4 (67)	2 (33) ^b	
Control		8		2 (25)	6 (75) ^{a,b}	
	24 horas					
BCB+		21		2 (10)	12 (57) ^{a,b}	7 (33)
BCB-		19	4 (21)	7 (37)	6 (31,5) ^b	2 (10,5)
Control		11		2 (18)	9 (82) ^a	

0: intensidad nula; 1: intensidad media-baja; 2: intensidad media–alta; 3: intensidad alta. Los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (Test de Fisher, $P < 0,05$)

STUDY OF MITOCHONDRIAL ACTIVITY IN LAMB OOCYTES SELECTED BY DE BRILLIANT CRESYL BLUE TEST.

ABSTRACT: The aim of this investigation was to as to evaluate the utility of the brilliant cresyl blue (BCB) test as an indirect measure of oocyte growth, in order to select competent prepubertal sheep oocytes for in vitro embryo production. Oocytes were exposed to 26 μ M BCB and were classified according to their cytoplasm coloration: oocytes with a blue cytoplasm, hypothetically grown oocytes (BCB+) and oocytes without a blue cytoplasm, hypothetically growing oocytes (BCB-). After exposure to BCB test, we evaluated mitochondrial activity on immature oocytes and on maturated ones. Mitochondrial activity was measures using the fluorescence probe Mitotracker Orange CMTMRos. The activity was classified into 4 groups of intensities: from type 0 which means no active mitochondria's, to type 3 which means high mitochondria intensity. The fluorescence intensity of metabolic active mitochondria increased in the oocytes during IVM and depended on initial classification into BCB+ or BCB-. Oocytes classified as BCB+ had much more active mitochondrias at 0 hours than BCB-. These results indicate that there is a relationship between the selection of good quality oocytes with BCB test and mitochondrial activity

Keywords: sheep oocytes, glucose-6-phosphate dehydrogenase, mitochondrial activity