

Competencia del ovocito bovino obtenido por Ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de Cresilo

Competition of the bovine oocyte obtained by Ovum pick-up, valued by the brilliant cresyl blue

Samaniego, J.X.*, Ayala, L.E., Nieto, P.E., Rodas, E.R., Vázquez, J.M., Murillo, Y.A., Dután, J.B., Calle, G.R., Argudo, D.E., Perea, F.P.

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador.

Autor de correspondencia: *jorgereivax@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN

La clasificación morfológica de los COC's (complejos cumulus ovocitos), junto a la determinación del diámetro folicular y ovocitario han sido los métodos más utilizados para la selección de gametas previo a la producción *in vitro* de embriones (PIV). En un principio los COC's aptos para PIV eran seleccionados por criterios morfológicos que proporcionaban pautas razonables para identificar el potencial de fertilización, pero los ovocitos bovinos han demostrado una alta variabilidad al momento de evaluar el citoplasma debido a su poca o nula traslucidez. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que estos métodos son ineficientes, ya que apenas el 60% de los COC's seleccionados alcanzan la fase de blastocisto posterior a la fecundación (Alm, Torner, Löhrke, Viergutz, Ghoneim *et al.*, 2005). Ensayos han demostrado que los COC's inmaduros sintetizan una variedad de proteínas durante su crecimiento, entre ellas la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), la cual es sintetizada en la mitad de la primera fase (S) de crecimiento ovocitario y que disminuye conforme el ovocito termina su fase de crecimiento. La tinción con azul brillante de Cresilo permite seleccionar de una manera no invasiva y perturbadora a los COC's más homogéneos y competentes para la PIV; esto debido a que permite determinar la actividad de la enzima G6PDH (Pujol, López-Béjar & Paramio, 2004). Al ser considerada como una técnica relativamente nueva, existe poca documentación y mucha controversia. Por esto, el objetivo de la investigación fue utilizar la prueba del azul brillante de Cresilo como método indirecto para seleccionar ovocitos de mayor competencia para la PIV.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colección y clasificación de los COC's

Se utilizaron como donadoras de ovocitos dos vaquillas de raza Criolla, sometidas a un proceso de estimulación hormonal; día 0, GnRH (Conceptal[®]), dosis 0.2 mg por vía IM; día 2, 500 U.I FSH-LH (Pluset[®]), día 2 y 48 h después Ovum Pick-up (OPU). Los COC's recuperados fueron transportados y clasificados morfológicamente en: A = ovocito de apariencia compacta, con >4 capas de células del cumulus, citoplasma granular uniforme y transparente; B = ovocito con 1 a 3 capas de células del cumulus que cubren la zona pelúcida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granulado; C = ovocitos totalmente desnudos, y/o citoplasma con zonas oscuras irregulares y D = ovocitos deformados con células de la granulosa que cubren parcial o totalmente la zona pelúcida o completamente expandidos con cumulus disperso y descolorido.

2.2. Prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB)

Todos los ovocitos seleccionados como A, B, C y D, fueron colocados en 26 μ M de BCB diluido en PBS (Dulbecco) durante 90 minutos a 38°C y CO₂ al 5%. Posterior a la exposición cada grupo de ovocitos fue lavado tres veces en una solución atemperada de PBS y examinado bajo estereoscopia para determinar si habían terminado su crecimiento (BCB+) o no (BCB-).

2.3. Diseño experimental

La investigación fue de tipo experimental, tuvo dos tratamientos y cinco repeticiones; en la que Tratamiento 1 (T1) = COC's recuperados de vaquillas estimuladas, y Tratamiento 2 (T2) = COC's recuperados de vaquillas no estimuladas (testigo). Para el análisis de los datos, se utilizó un modelo lineal general a través del PROC GLM en el SAS vw 9.3. Las diferencias entre medias se compararon mediante la prueba de Tukey-Kramer.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra la relación entre el número de folículos visualizados por ecografía y el número de COC's recuperados por OPU. Como era de esperarse, el tratamiento 1 (con estimulación) permitió recuperar 5.2 más COC's que el grupo testigo (sin estimulación) ($P < 0.05$). La tasa de recuperación en T1 fue 17.1% superior a T2 ($P < 0.05$).

Tabla 1. Número de folículos visualizados y COC's recuperados por OPU en cada uno de los tratamientos.

	Folículos visualizados N/(\bar{X} +EE)	COC's recuperados N/(\bar{X} +EE)	Recuperación %
Tratamiento: T1	112/(11.2 \pm 0.69 ^a)	90/(9.0 \pm 0.63 ^a)	80.4 ^a
Tratamiento: T2	72/(6.0 \pm 0.89 ^b)	12/(3.8 \pm 0.57 ^b)	63.3 ^b
Total	148/(16.2)	102/(12.8)	68.9

Valores con letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (^{a, b} = $P < 0.05$)

El porcentaje de recuperación en la presente investigación denota la eficiencia alcanzada en la técnica de OPU. La diferencia entre tratamientos podría ser explicada por el protocolo de estimulación utilizado, que permitió obtener folículos más homogéneos que facilitaron la punción eco-guiada, esta característica no se presentó en el tratamiento 2 (vaquillas sin estimulación ovárica) ya que en este existió mayor diversidad de tamaño en los folículos presentes en el momento de la OPU (Torres-Júnior, Pires, de Sá, Ferreira, Viana *et al.*, 2008).

En la Tabla 2 se puede observar que del total de COC's recuperados (9,0 \pm 0,63) de animales estimulados hormonalmente, el 26.7% correspondió al tipo A; 34.4% al B; 21.1% al C y 17.8% al D; sin embargo, en el tratamiento 2 (sin estimulación) un 13.2% fueron clasificados como A; 23.7% B; 47.4% C y 13.2% D, presentando diferencias entre tratamientos en los tipos A, B y D ($P < 0,05$). Autores como Ireland, Ward, Jimenez-Krassel, Ireland, Smith *et al.* (2007) consideran a los ovocitos de categorías A y B como aptos para PIV y a C y D como no aptos; tomando esta agrupación como referencia, se puede decir que en T1 el 61.1% de los ovocitos de esta investigación serían considerados como aptos y un 38.9% no aptos. Por otra parte, en T2 se obtuvo un 36.9% de aptos y un 60.6% de no aptos. Esto es corroborado por Blondin, Vigneault, Nivet & Sirard (2012) quienes señalaron que ovocitos provenientes de hembras no estimuladas hormonalmente tuvieron menor competencia que ovocitos de hembras estimuladas.

Tabla 2. Número de COC's, clasificados en base a su morfología (Tipo A; B; C; D) y su actividad al BCB en cada tratamiento.

Tipo COC's	A X̄±EE/(%)	B X̄±EE/(%)	C X̄±EE/(%)	D X̄±EE/(%)
Tratamiento 1	2.4 ±0.38a/(26.7)	3.1 ±0.55a/(34.4)	1.9 ±0.44a/(21.1)	1.6 ±0.30a/(17.8)
Tratamiento 2	0.5 ±0.35b/(13.2)	0.9 ±0.50b/(23.7)	1.8 ±0.40a/(47.4)	0.5 ±0.27b/(13.2)
BCB+				
Tratamiento 1	2.4 ±0.38a/(100)	1.7 ±0.37a/(54.8)	1.3 ±0.36/(68.4)	0.9 ±0.26/(56.3)
Tratamiento 2	0.5 ±0.35b/(100)	0.5 ±0.34b/(55.5)	1.0±0.33/(55.5)	0.3 ±0.24/(60.0)
BCB-				
Tratamiento 1	0.0 ±0.00/(0)	1.4 ±0.54/(45.2)	0.6 ±0.34/(31.6)	0.7 ±0.23/(43.7)
Tratamiento 2	0.0 ±0.00/(0)	0.3 ±0.49/(44.5)	0.9 ±0.31/(44.5)	0.1 ±0.21/(40.0)

^{ab}=letras diferentes en la misma columna indican grupos diferentes; prueba de Tukey-Kramer. (P<0.05)

Al realizar la prueba del BCB, se determinó que el 100% de los ovocitos de tipo A de los tratamientos 1 y 2, fueron BCB+, es decir, habían terminado su crecimiento y podían continuar con su proceso de maduración. Además, se observó la tendencia a una mejor calidad morfológica y una mayor cantidad de ovocitos BCB+. Alrededor del 50% de los ovocitos de tipo B fueron BCB+, lo que permite argumentar que no todos los ovocitos de tipo B estaban listos para continuar con el proceso de maduración. Este comportamiento fue observado por (Pujol *et al.*, 2004) quienes demostraron que un 34% de los ovocitos seleccionados para PIV, según criterios morfológicos (grados 1 al 3), no habían terminado su crecimiento, es decir fueron BCB-.

Por otra parte, al analizar los ovocitos de tipo C y D no se observaron diferencias entre tratamientos, pero se determinó que alrededor del 50% de los ovocitos tanto de T1 y T2 fueron BCB+. La presencia de ese 50% de COC's de tipo C (COC's denudados), clasificados como BCB+, pudo deberse a factores mecánicos relacionados con las características de la aguja usada (diámetro, longitud, afilado, ángulo, etc.), y/o la presión de aspiración que produjo pérdida de las células del cúmulo. En cuanto a los ovocitos de tipo D, su comportamiento BCB+ se debe a que morfológicamente estaban maduros, es decir, habían terminado su crecimiento. No obstante, investigadores como Pujol *et al.* (2004) e Ireland *et al.* (2007) excluyen a los ovocitos de esta clasificación de la PIV por considerarlos no aptos para este tipo de Biotecnología. Por otra parte, se observó que alrededor del 50% de los ovocitos tipo D fueron BCB-, se considera que estos son extraídos de folículos en fase de atresia.

4. CONCLUSIONES

Según los resultados de este estudio, la selección de COC's basada en las características morfológicas es un método confiable únicamente para los de tipo A, mientras que tiene un 50% de error para los COC's de tipo B, C y D. Por esto, la aplicación de la prueba del BCB permite mejorar esta selección de forma no invasiva.

REFERENCIAS

- Alm, H., Torner, H., Lührke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I., Kanitz, W. (2005). Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, 63(8), 2194-2205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.050>
- Blondin, P., Vigneault, C., Nivet, A., Sirard, M. (2012). Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Animal Reproduction*, 9(3), 281-289.

- Ireland, J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Smith, G., Lonergan, P., Evans, A. (2007). Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, 22(6), 1687-1695. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem071>
- Pujol, M., López-Béjar, M., Paramio, M.-T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4), 735-744. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00250-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00250-4)
- de Torres-Júnior, J. R., de Pires, F. A., de Sá, W. F., de Ferreira, A., Viana, J. H., Camargo, L. S., Ramos, A. A., Folhadella, I. M., Polisseni, J., de Freitas, C., Clemente, C. A., de Sá Filho, M. F., Paula-Lopes, F. F., Baruselli, P. S. (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 69(2), 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.023>