

VOL 3 No 2 de 2019, Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal, ISSN 2602-8220

Uso del Azul Brillante de Cresilo en la selección de ovocitos competentes para la producción *in vitro* de embriones

J.M Duma²; Daniel Argudo¹; Rafael Ochoa¹; J. Alvarado¹; Luis E. Ayala Guanga¹

¹Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias

²Pregrado Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias

Autor de correspondencia: luis.ayala@ucuenca.edu.ec

Resumen:

El objetivo fue evaluar el Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la selección de ovocitos para la producción de embriones *in vitro* (PIV). Se valoraron tres tratamientos. G1=Testigo sin exposición al BCB; G2=ovocitos positivos a la tinción (BCB+) y G3=ovocitos negativos a la tinción (BCB-). Se determinó morfometría, maduración (MIV), configuración meiótica, clivaje y embriones. Se obtuvieron 2.340 complejos cúmulus ovocitos (COC's), clasificados en aptos y no aptos para la PIV. Las 2/3 partes fueron expuestas por 90 min., al BCB y los restantes incubados por 90 min en H-SOF. El 25% de COC's de cada grupo fue tomado para valorar la morfometría. El 75% restante se colocó en medio de maduración por 24h. Luego de la MIV un 25% de COC's se utilizó para la morfometría y la progresión meiótica. El 50% restante fue fertilizado *in vitro* (FIV) y cultivado. El clivaje se evaluó 48h después de la FIV y los embriones al día 8. El 62,3% de ovocitos de G2 fueron BCB+ y presentaron un diámetro mayor antes (135,9 μm) y después (134,8 μm) de la MIV ($P<0,05$) vs el grupo 3 BCB- (128,1 y 127,6 μm) y el Testigo (129,0 y 128,2 μm). La maduración y la configuración meiótica no fueron diferentes entre grupos ($P>0,05$). El clivaje fue mayor ($P<0,05$) en el Testigo (43,4%) que el grupo BCB+ (33,5%). Finalmente, el porcentaje global de embriones fue mayor en BCB+(52,6%) que el Testigo (32,6%) y BCB- (33,5%). Se concluye que el BCB permitió seleccionar ovocitos con mayor diámetro, a pesar de que no permitió aumentar el porcentaje de maduración y clivaje, contribuyó a mejorar el porcentaje global de embriones obtenidos *in vitro*.

Palabras clave: ovocitos, azul brillante de cresilo, embriones, *in vitro*, maduración.

The objective was to evaluate the Cresil Brilliant Blue (BCB) in the selection of oocytes for the production of *in vitro* embryos (IVP). Three treatments were evaluated. G1 = Control without exposure to BCB; G2 = staining positive oocytes (BCB +) and G3 = staining negative oocytes (BCB-). Morphometry, maturation (MIV), meiotic configuration, cleavage and embryos were determined. 2,340 cumulus oocyte complexes (COCs) were obtained, classified as suitable and not suitable for IVP. The 2/3 parts were exposed for 90 min to the

BCB and the rest were incubated for 90 min in H-SOF. The 25% of COCs of each group was taken to assess the morphometry. The remaining 75% was placed in the middle of maturation for 24 hours. After IVM, 25% of COCs were used for morphometry and meiotic progression. The remaining 50% was fertilized in vitro (IVF) and cultivated. Cleavage was evaluated 48h after IVF and embryos on day 8. 62.3% of G2 oocytes were BCB + and had a larger diameter before (135.9 μm) and after (134.8 μm) of MIV ($P < 0.05$) vs group 3 BCB- (128.1 and 127.6 μm) and the control (129.0 and 128.2 μm). Maturation and meiotic configuration were not different between groups ($P > 0.05$). The cleavage was greater ($P < 0.05$) in the control (43.4%) than the BCB + group (33.5%). Finally, the overall percentage of embryos was higher in BCB + (52.6%) than the Control (32.6%) and BCB- (33.5%). It is concluded that the BCB allowed the selection of oocytes with greater diameter, although it did not allow to increase the percentage of maturation and cleavage, it contributed to improve the overall percentage of embryos obtained in vitro.

Key words: oocytes, bright cresyl blue, embryos, in vitro, maturation.

Introducción

La producción *in vitro* de embriones empleando ovocitos provenientes de ovarios de animales post mortem ha sido ampliamente utilizados en los últimos años como una estrategia para aumentar la eficiencia reproductiva de las hembras y la preservación de recursos genéticos de animales potencialmente productivos (Gordon, 2003). Sin embargo, a pesar de la optimización que esta biotecnología tiene hoy en día, aun presenta una baja eficiencia, considerando que solo el 20-40% de los ovocitos recuperados inicialmente llegan a convertirse en blastocistos (Hasler, 2007) Se ha establecido que uno de los factores que influye sobre este bajo porcentaje, es la calidad o la baja competencia ovocitaria, sumado a la variabilidad de la fuente de animales de donde se obtienen los ovocitos (Karima et al., 2017).

La calidad de los ovocitos para la PIV tradicionalmente se basa en la evaluación morfológica visual considerando el número de capas de las células del cumulus, la homogeneidad del citoplasma y la integridad de la zona pelúcida; sin embargo, bajo esta metodología subjetiva ha sido más difícil la selección ovocitos competentes (Hopper, 2015). Por este motivo se viene investigado la utilización de la tinción vital azul brillante de cresilo, colorante que determina la actividad enzimática de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, (G6PDH), misma que disminuye a medida que los ovocitos alcanzan su crecimiento y competencia, de tal manera que los ovocitos que han alcanzado su tamaño máximo al tener nula o baja

actividad de la G6PDH no degradan el colorante y tiñen el citoplasma de color azul (Opiela & Lucyna, 2013).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficacia de la tinción BCB en la selección de ovocitos bovinos competentes para la PIV, con base a la morfometría, maduración, clivaje y desarrollo al estado de embriones.

Materiales y métodos

Los materiales de plástico como cajas de cultivo, tubos, utilizados en nuestro experimento se obtuvieron de Nunc; los medios de cultivo y productos químicos de Sigma, St. Louis, MO, EEUU, excepto la tinción "Azul brillante de cresilo", que se adquirió en PanReac AppliChem, Barcelona, España.

Obtención, procesamiento y clasificación de COC's

Los complejos cumulus ovocitos se obtuvieron de ovarios bovinos del Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP). Estos ovarios se procesaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, mediante aspiración folicular se recuperaron los COC's de folículos ováricos comprendidos en un diámetro entre 3–8 mm. Posteriormente se clasificaron morfológicamente de acuerdo al criterio de (Samaniego et al., 2017); únicamente los COC's aptos fueron seleccionados para el experimento.

Tinción con azul brillante de cresilo

Para efectuar la tinción BCB los COC's aptos (n=1.758) se dividieron aleatoriamente en grupos: grupo 1 o Testigo (n=600) que contenía el 33% del total de COC's de cada sesión se incubaron directamente en medio fluido oviductal sintético suplementado con Hepes (H-SOFT). El 77 % de los COC's restantes fueron expuestos por 90 minutos a la tinción vital de 26 μ M de Azul Brillante de Cresilo (BCB). Después de la exposición al BCB, los COC's que tiñeron el citoplasma de azul fueron colocados en el Grupo 2: BCB+ (n= 721) y sin coloración en el Grupo 3 o BCB- (n=437).

Evaluación de la morfo-metría antes y después de la maduración *in vitro*

Se seleccionó el 25 % de los ovocitos de cada grupo, y estos fueron denudados por pipeteo en una solución de H-SOF suplementada con Hialuronidasa (1mg ml⁻¹). Posteriormente, mediante una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) acoplada a un microscopio con lente 10x, y la ayuda de un software ACCU-Scope Capta Vision 2.0, se fotografiaron

los ovocitos y se realizaron medidas de cada una de las partes del ovocito de acuerdo a la metodología establecida por (Ueno & Nimura, 2009).

Maduración, fertilización y cultivo *in vitro*

Los ovocitos se cultivaron en medio de maduración (TCM-199 suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 µg mL⁻¹ de piruvato de sodio, 0.75 mg mL⁻¹ de L-glutamina, 4 µg mL⁻¹ de FSH-p, 100 µM de cisteamina y 250 µg mL⁻¹ de gentamicina) durante 24 h a 38,5°C y 5% de CO₂ en atmósfera de aire humidificado. La fertilización se llevó a cabo añadiendo 1x10⁶ espermatozoides/ml. Los presuntos cigotos fueron desnudados y cultivados durante 8 días. Se valoró la maduración morfológica de acuerdo a la expansión de las células del cumulus y el progreso de la meiosis a las 24h de la colocación de los COCs en el medio de MIV; el clivaje se valoró 48h después de la FIV y el número de embriones al día 8 de cultivo.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar, considerándose como variables independientes el estado metabólico de la G6PDH determinado mediante la tinción BCB como método de clasificación de ovocitos competentes y como variables dependientes la morfometría de los ovocitos, la maduración *in vitro*, configuración meiótica, el porcentaje de clivaje y embriones. Los datos fueron analizados en el software estadístico SPSS, versión 25.

Resultados y Discusión

Recuperación de COC's y prueba BCB

Se procesaron 388 ovarios de matadero en 13 sesiones, obteniendo 2.340 COC's, de los cuales 1.758 COC's fueron considerados aptos. 1.1158 COC's fueron expuestos a la prueba BCB, que luego de la tinción el 62,3% resultaron BCB+, porcentaje superior (57,9%) al encontrado por Alm et al., (2005), sin embargo, es inferior (65%) al establecido por (Silva, et al., 2013).

Morfometría

La evaluación de la morfometría determinó que los ovocitos del grupo BCB+ (G2) antes (135,9 µm) y después (134,8 µm) de la MIV fueron significativamente más grandes en diámetro (P<0,05) que los ovocitos del grupo BCB- (128,1 y 127,6 µm) y el grupo Testigo

(129,0 y 128,2 μm). Un estudio previo también ha evidenciado que los ovocitos BCB+ fueron de mayor tamaño que los BCB- (Pujol et al., 2004).

Maduración morfológica y meiótica del COC

La valoración morfológica de la maduración de los ovocitos luego de 24h considerando la expansión de las células del cúmulus no difirió estadísticamente entre el grupo Testigo, BCB+ y BCB- (G1:88,2%; G2: 86,8% y G3: BCB- 86,1%). De la misma manera, la progresión de la meiosis o maduración nuclear en los diferentes estadios fue similar en los tres grupos ($P < 0,05$). Aunque existe otros estudios que han determinado que el progreso de la meiosis a metafase II resulto mayor en el grupo BCB+ (Silva et al., 2013). A pesar de eso la maduración *in vitro* óptima se complementa con la extrusión del primer cuerpo polar, la redistribución de las organelas citoplasmáticas y un buen sistema de cultivo.

Clivaje y desarrollo de embriones

Con respecto al clivaje se determinó que el grupo Testigo (43,4%) presento un porcentaje significativamente mayor que el grupo BCB+ (33,5%); sin embargo, no se encontró diferencia con el grupo BCB- (34,8%). Estos resultados evidencian que el porcentaje de clivaje del grupo BCB+ se vio afectado por la tinción, contrario a lo que afirma los resultados de (Bhojwani et al., 2007) y (Mota et al., 2009) que obtienen tasas de clivaje superiores en el grupo expuesto al BCB.

Finalmente, el porcentaje de blastocitos del grupo Testigo obtuvo una tasa de 19,3%, el grupo BCB+ 24,8% y el grupo BCB- 13,6%. Los tres grupos no fueron estadísticamente diferentes. ($P > 0,05$), similar al estudio de (Opiela & Lucyna, 2013). No obstante, el total de embriones combinados mórulas y blastocistos el grupo BCB+ (52,6%) obtuvo el porcentaje más alto que el grupo Testigo (32,6%) y BCB- (30,9%).

Alm et al. (2005); Mota et al. (2009); y Salivano et al. (2015) en sus investigaciones han obtenido tasas de blastocistos notablemente superiores en el grupo BCB+, lo que indica que la tinción fue efectiva para la selección de ovocitos competentes para superar el desarrollo embrionario temprano, que es el periodo más crítico de la producción *in vitro* de embriones.

Conclusiones

Los ovocitos con baja o nula actividad de la enzima G6PDH (BCB +) tienen un mayor diámetro antes y después de la maduración *in vitro* en comparación con el grupo BCB-. Si bien no permitió aumentar el clivaje, el porcentaje global de embriones obtenidos *in vitro* en este grupo fue superior.

Conflicto de Intereses

No hubo problemas de diferencias entre los autores del trabajo y ni del equipo de trabajo en su desempeño en el trabajo de Laboratorio.

Agradecimientos

Reconocimiento especial al equipo profesional del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal y a la Universidad de Cuenca.

Referencias Bibliográficas

- Alm, H., Torner, H., Löhrike, B., Viergutz, T., Ghoneim, I. M., & 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>
- 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(2), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.006>
- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos. Molecular and Cellular Biology* (2nd ed.). Wallingford: CABI Publishing.
- Hasler, J. F. (2007). Embryo transfer and *in vitro* fertilization. In *Comparative Reproductive Biology*. (Vol. 33, pp. 171–211). Ames: Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470390290.ch8>
- Hopper, R. (2015). *Bovine reproduction* (1st ed.). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Karima, G., El-Naby, A., Elraay, M., Youssef, Y., Sosa, G., & Abou El-Roos, M. (2017). Impact of using brilliant cresyl blue stain on oocyte and embryo selection. *Egyptian*

Journal of Veterinary Sciences, 48(1), 43–51.

- Mota, G. B., Tavares Pereira, R., Serapiao, R., Cortes, M., Moreira Viana, H., Alves Torres, C., & Almeida, L. S. (2009). Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote*, 18(5), 209–216. <https://doi.org/10.1017/S0967199409990219>
- Opiela, J., & Lucyna, K. (2013). The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). *Reproductive Biology*, 13(3), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.07.004>
- 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)
- Samaniego, J., Ayala, L., Nieto, P., Rodas, E., Vazquez, J., Murillo, Y., ... Perea, F. (2017). Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Maskana Produccion Animal*, 8(2), 77–80.
- Silva, D., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N., & Rodrigues, J. (2013). Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: Effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, 21(3), 250–255. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000487>
- Ueno, S., & Nimura, S. (2009). Comparision of the size previtelin space in mouse oocytes cultured with and without cumulus cells and possible hyaluronan production in oocytes. *Informe de Investigación de La Facultad de Agricultura de La Universidad de Niigata*, 61(2), 127–133.