

## CARACTERIZACIÓN MITOCONDRIAL DE OVOCITOS BOVINOS SELECCIONADOS MEDIANTE BCB

Lamas-Toranzo I, Pericuesta E, Bermejo-Álvarez P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto Reproducción Animal, INIA. Avda Puerta de Hierro 12 local 10, 28040 Madrid, España.  
borrilobermejo@hotmail.com

### INTRODUCCIÓN

La maduración *in vitro* constituye el principal escollo para mejorar las tasas de producción de embriones *in vitro*. En este sentido, las tasas de producción de blastocistos fecundados y cultivados *in vitro* oscilan entre un 30 y 40 % cuando se emplean ovocitos madurados *in vitro*, mientras que empleando ovocitos madurados *in vivo* el porcentaje de blastocistos asciende hasta un 60 % (Rizos et al., 2002). Los ovocitos empleados para la maduración *in vitro* se seleccionan en base al tamaño folicular y a su morfología, parámetros que permiten excluir ovocitos atrésicos o en fases incipientes de desarrollo folicular, pero que no evitan la selección de ovocitos que no han completado su desarrollo folicular. La tinción vital de azul brillante de cresilo (BCB) permite seleccionar los ovocitos que han finalizado su crecimiento folicular en base a la actividad de la enzima G6PDH (Ericsson et al. 1993, Rodríguez-González et al. 2002, Alm et al. 2005). El método se basa en la degradación de la tinción BCB por la enzima G6PDH, cuya actividad es elevada en ovocitos en crecimiento (BCB-) y disminuye en aquellos que han finalizado su crecimiento (BCB+) y son más competentes para madurar.

Las mitocondrias son el orgánulo más abundante en el ovocito de los mamíferos (Van Blerkom et al 2000). Durante el crecimiento folicular el ovocito multiplica su número de mitocondrias y la cantidad de ADN mitocondrial (Cao et al 2007). Las mitocondrias presentes en el ovocito juegan un papel clave en distintos procesos como la fecundación o el metabolismo del embrión preimplantacional. En este sentido, se han asociado un bajo contenido en ADN mitocondrial a fallos en la fecundación (Reynier et al 2001). El objetivo de este estudio ha sido analizar las diferencias en distribución mitocondrial, cantidad de ADN mitocondrial, y expresión del factor de transcripción mitocondrial *TFAM* entre ovocitos BCB+ y BCB-.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) bovinos se obtuvieron de ovarios procedentes de matadero mediante la aspiración de folículos de un diámetro entre 2 y 8 mm. A continuación se seleccionaron los COCs de grado 1 en base a los criterios morfológicos establecidos por la IETS y se incubaron en una solución de 52  $\mu$ M BCB en PBS suplementado con BSA durante 90 minutos. Después de la incubación los COCs se dividieron en BCB+ (muestran una coloración azul) o BCB- (no muestran coloración).

En un primer experimento se evaluó la capacidad de desarrollo de los ovocitos BCB+ y BCB-. Para ello se llevó a cabo maduración, fecundación y cultivo *in vitro* con ovocitos BCB+ o BCB- siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio (Bermejo-Álvarez et al 2010). Se anotó el porcentaje de división a las 48 horas postfecundación y el desarrollo a blastocisto en días 7, 8 y 9 en tres réplicas independientes.

Un segundo experimento consistió en la evaluación morfológica de los ovocitos BCB+ y BCB-. Para ello, inmediatamente después de la selección, se eliminaron las células del cúmulo mediante agitación en vortex durante 3 minutos en una solución de 300  $\mu$ g/ml de hialuronidasa en PBS. Los ovocitos desnudos (sin células del cúmulo) se observaron mediante un sistema de análisis de imagen compuesto por un microscopio invertido Nikon Eclipse y el software NIS, que permite realizar mediciones de tamaño en planos focales. Los parámetros analizados en 20 ovocitos por grupo fueron el diámetro del ovocito y el grosor de la zona pelúcida.

El tercer experimento analizó la distribución mitocondrial mediante microscopía confocal. Para ellos se incubaron 20 ovocitos desnudos por grupo en una solución con MitoTracker® Deep red FM 0,5  $\mu$ M en PBS, durante 30 minutos a 38,5°C. Posteriormente, se observaron en un microscopio confocal tomando z-stacks de 5  $\mu$ m.

El cuarto experimento evaluó el contenido en ADN mitocondrial mediante qPCR a tiempo real, amplificando una secuencia del gen mitocondrial *COX1*. Para ello se eliminó la zona pelúcida de los ovocitos desnudos BCB+ y BCB-, guardándolos individualmente a -80 °C

hasta ser analizados. Cada ovocito se digirió en 8  $\mu$ l de una solución de 100  $\mu$ g/ml de proteinasa K mediante incubación a 65 °C durante 1 h seguida de inactivación de la enzima a 95 °C durante 10 min. El lisado inactivado se utilizó como molde para la PCR a tiempo real siguiendo protocolos ya descritos (Bermejo-Álvarez et al 2008), analizando 20 ovocitos por grupo. El análisis de datos se llevó a cabo obteniendo la cantidad relativa a la media del grupo con menor contenido mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

El último experimento consistió en el análisis transcripcional de ovocitos y células del cúmulo procedentes de COCs BCB+ y BCB-. Los ovocitos se obtuvieron como se ha descrito anteriormente. Las células del cúmulo se obtuvieron mediante centrifugación del medio en el que se desnudaron los ovocitos. Se analizaron 5 grupos de 10 ovocitos y 5 grupos de células del cúmulo correspondientes a 10 COCs por cada grupo experimental. La extracción de ARN mensajero, retrotranscripción y análisis de la abundancia relativa mediante PCR a tiempo real se llevó a cabo como en Bermejo-Alvarez et al 2010, utilizando como gen de referencia *PPIA1*. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ovocitos BCB+ dieron lugar a mayores tasas de división embrionaria y desarrollo a blastocisto que los BCB- (Fig. 1A). La evaluación morfológica del tamaño no observó ninguna diferencia entre ovocitos BCB+ y BCB- (Fig. 1B), confirmando que ambas poblaciones no pueden distinguirse a simple vista en la selección convencional visual y en ambos casos se trata de ovocitos en un estadio folicular avanzado que han alcanzado su tamaño definitivo, aunque en el caso de los BCB- aún no han completado totalmente su desarrollo folicular.

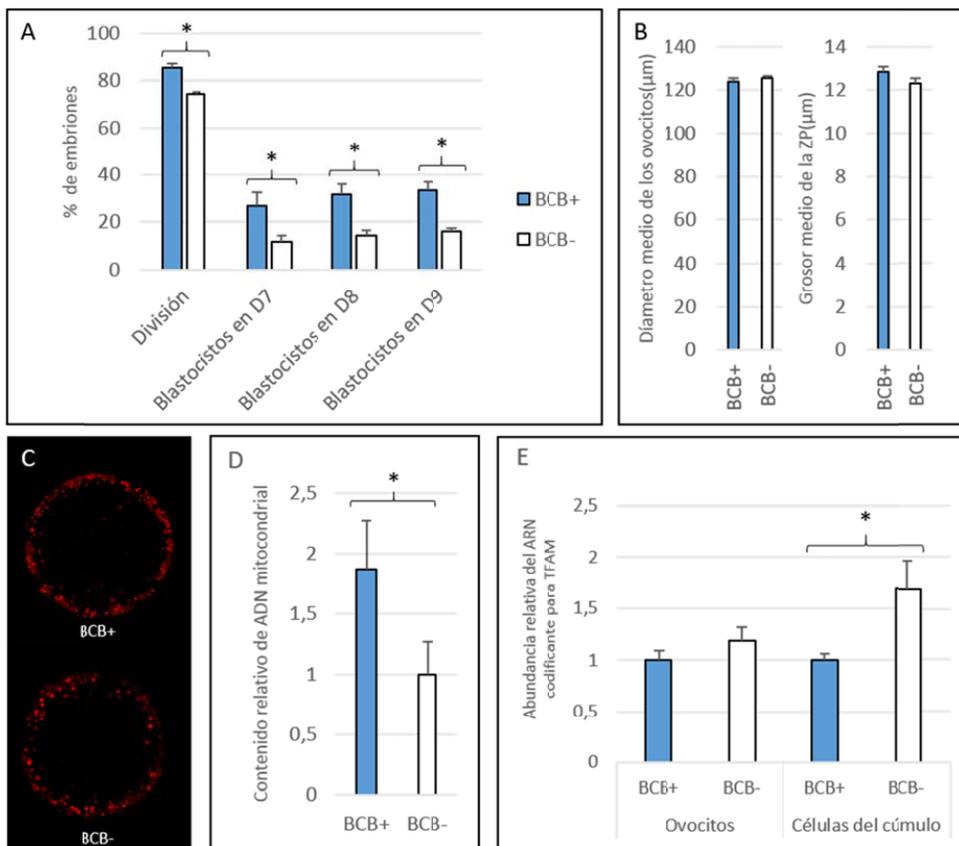
La distribución mitocondrial fue similar en ambos grupos, siendo claramente pericitoplásmica (Fig. 1C). Sin embargo, se observó que los ovocitos con una menor competencia (BCB-) tenían menor cantidad de ADN mitocondrial que los más competentes (BCB+) (Fig. 1D). La cantidad relativa de ARN mensajero del factor de transcripción mitocondrial *TFAM*, esencial para la replicación del ADN mitocondrial, fue similar en los ovocitos BCB+ y BCB-, pero fue significativamente superior en las células del cúmulo obtenidas de COCs BCB- (Fig 1E). La mayor actividad transcripcional de este gen en las células del cúmulo de COCs que aún no han completado totalmente su desarrollo folicular puede estar relacionado con el aumento en ADN mitocondrial que experimentan desde ese momento (BCB-) hasta completar su desarrollo (BCB+).

En conjunto, estos datos sugieren que en la última fase del desarrollo folicular, donde los ovocitos ya tienen el tamaño definitivo pero aún no han alcanzado la competencia de desarrollo definitiva, tiene lugar una amplificación del ADN mitocondrial que puede ser la responsable de las menores tasas de desarrollo obtenidas con ovocitos BCB-.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alm et al. 2005 Theriogenology 63:2194-2205.
- Bermejo-Alvarez et al 2008 Physiol Genomics 32(2):264-272.
- Bermejo-Alvarez et al 2010 Reprod Biomed Online 20(3):341-349.
- Cao et al 2007 Nat Genet 39:386-390.
- Ericsson et al. 1993 Theriogenology 39:214.
- Rodríguez-González et al. 2002 Theriogenology 57(5):1397-1409.
- Reynier et al 2001 Mol Hum Reprod 7:425-429.
- Rizos et al. 2002 Mol Reprod Dev 61:234-248.
- Van Blerkom et al. 2000 Hum Reprod 15(Suppl.2):173-188.

**Agradecimientos:** Los experimentos se han llevado a cabo gracias a la financiación de los proyectos del Ministerio de economía RYC-2012-10193 y AGL2014-58739-R. Ismael Lamas Toranzo está financiado por un contrato FPI.



**Figura 1.** Diferencias de desarrollo, morfológicas y mitocondriales entre ovocitos BCB+ y BCB- bovinos: A) Porcentajes de división y desarrollo a blastocisto; B) Diámetro del ovocito y grosor de la zona pelúcida; C) Imagen confocal representativa de la distribución mitocondrial pericitoplásmica obtenida en ambos grupos; D) Contenido relativo de ADN mitocondrial en ovocitos; E) Abundancia relativa del ARN codificante para TFAM en ovocitos y células del cúmulo.

### MITOCHONDRIAL CHARACTERIZATION OF BCB-SELECTED BOVINE OOCYTES

**ABSTRACT:** Brilliant cresyl blue (BCB) staining allows to sort oocytes that have finished their follicular development (BCB+) based on G6PD activity. The aim of this study has been to characterize BCB+ and BCB- bovine oocytes, preselected based on morphological criteria, in terms of developmental competence, size, mitochondrial distribution, mtDNA quantification and expression of the mtDNA transcription factor *TFAM*. The *in vitro* developmental competence following IVF, measured as cleavage rate and blastocyst yield on D7, 8 and 9, was significantly higher for BCB+ oocytes compared to BCB-. Oocyte diameter and zona pellucida thickness were similar in both groups, suggesting that although BCB- oocytes have not completed follicular development, they have reached the final size. Mitochondrial distribution, analysed by confocal imaging and Mitotracker deep red, was pericentriolar in all oocytes analysed in both groups. mtDNA content, measured by qPCR, was significantly higher in BCB+ oocytes, suggesting that mtDNA replicates at the final stage of follicle development, after the oocytes have reached their final size. In agreement, the expression of *TFAM*, involved in mtDNA replication, was significantly higher in cumulus cells from BCB- oocytes.

**Keywords:** BCB, oocyte competence, mitochondria, follicular growth.