

Evaluación de la viabilidad de ovocitos bovinos mediante la utilización de 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

Calvo J.¹; Pérez V.²; Fila D.¹; Campos E.³



RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la viabilidad de los Complejos Cúmulo Ovocitos (CCOs) bovinos mediante la utilización del 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

Se aspiraron folículos de 2-5 mm de diámetro de ovarios de vacas sacrificadas en frigorífico y se seleccionaron los CCOs de acuerdo a las características del cúmulo (completo, parcial o ausente) y del citoplasma del ovocito (uniforme, vacuolado o atigrado). Se clasificaron 512 CCOs como categoría A (cúmulo completo y citoplasma uniforme), 503 como B (cúmulo incompleto y citoplasma uniforme) y 439 C (ausente de cúmulo y citoplasma uniforme). Se incubaron en una solución de MTT a 37 °C, en atmósfera al 5% de CO₂ y 99% de humedad durante 4 horas. El MTT es incoloro o débilmente amarillento, atraviesa la membrana celular y al ser reducido por enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias precipita en cristales de formazan de color azul intenso. La coloración fue considerada negativa en los CCOs que no mostraron cambios y débil, moderada o intensa en los que presentaron un cambio de coloración con diferente intensidad. La mayoría de los CCOs A y B (buena calidad) mostraron cambios de coloración, evidenciando una destacada actividad enzimática, mientras que en el 23,1% de ellos no se evidenciaron cambios. Aproximadamente el 45% de los CCOs C (menor calidad) la coloración no se modificó, clasificándose como negativos. La determinación de la calidad de los CCOs requiere de la incorporación de técnicas que pongan en evidencia aspectos de su estructura y función.

Palabras Clave: Complejo Cúmulos Ovocito, Viabilidad, MTT.

SUMMARY

The purpose of the present work was to evaluate the viability of bovine Cumulus Oocyte Complex (COC), using 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

The COC's were obtained by aspirating 2-5mm follicles from the ovaries of cows at slaughter. The COCs were selected according to the characteristics of the cumulus (complete, partial or absent) and the cytoplasm of the oocytes (uniform or vacuolated). The COCs were classified in three groups: 512 (category A= complete cumulus and uniform cytoplasm), 503 (category B= incomplete cumulus and uniform cytoplasm) and 439 (category C= uniform cytoplasm and no cumulus). The COCs were incubated with MTT solution at 37°C, 5% CO₂ and 99% humidity during 4 hours. MTT is colorless or light yellow and penetrates the cellular membrane, this solution changes to dark blue by the reduction of mitochondria dehydrogenases. The staining was negative when the COCs did not show changes, and light, moderate or intense when the COCs showed color changes with different intensity. The majority of COCs in categories A & B (good quality) showed color changes, meaning that the enzymatic activity increased. Twenty three percent of A & B COCs showed negative staining. Approximately 45% of COCs in C category (poor quality), showed no color change, being classified as negative. To determine the quality of the COCs it is necessary to use techniques that show functional and structural characteristics.

Key words: Cumulus Oocyte Complex, viability, MTT.

INTRODUCCIÓN

A partir de los trabajos de Gordon & Lu (1990) (6), la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos con fines comerciales, ha progresado enormemente en la última década. El éxito en los resultados de un programa de fertilización *in vitro* depende básicamente, de que los ovocitos, tanto en el ovario (*in situ*) como fuera de él (*in vitro*) se en-

cuentren dentro de los parámetros ultraestructurales normales; así como del correcto proceso de aspiración y maduración utilizado (12).

El desarrollo normal de un embrión solo es posible luego de la fecundación de un ovocito que ha cumplido adecuadamente su proceso de maduración. La selección de los ovocitos junto a las células del cúmulo para programas de maduración y

fertilización *in vitro* se realiza en microscopio estereoscópico teniendo en cuenta aspectos morfológicos relacionados al número de capas de células del cúmulo (completo, parcial o ausente) y del citoplasma del ovocito (uniforme, vacuolado, atigrado) (10). Las técnicas de coloración citológicas cumplen un importante rol en la evaluación de la calidad de los ovocitos y embriones, permitiendo el análisis de algunos de sus aspectos es-

Recibido: 16/02/04 Aprobado: 29/03/04

¹Área de Histología y Embriología, Facultad de Veterinaria. Lasplacas 1550. Montevideo, Uruguay. Tel/Fax: 622.2933. E-mail: juancalvouy@yahoo.es

²Área de Morfología, Facultad de Medicina. Universidad de Brasilia, Brasilia. Brasil.

³Departamento de Biología Celular. Universidad de Brasilia, Brasilia. Brasil.

estructurales y ultra-estructurales. Estas técnicas adquieren especial importancia cuando no provocan ni requieren de la muerte celular en el momento de su aplicación. Ellas permiten la evaluación de parámetros relacionados con la actividad metabólica de células y tejidos. El MTT permite el estudio de la actividad de varias enzimas deshidrogenasas y ha sido utilizado con éxito en el estudio de la viabilidad y proliferación celular a partir de la evaluación de la actividad metabólica de las mitocondrias, (13,14). Esta investigación tiene por objetivo evaluar por medio de la utilización del MTT la viabilidad de los CCOs bovinos obtenidos por punción de folículos de ovarios de animales sacrificados en frigorífico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de ovocitos

Los ovocitos fueron aspirados de folículos de 2 a 5 mm de diámetro de ovarios obtenidos de vacas en frigorífico, inmediatamente después del sacrificio. Los ovarios fueron trasladados al laboratorio en solución fisiológica al 0.9% y penicilina-estreptomicina (100.000 UI/L y 100 mg/L) respectivamente a 30° C. La aspiración de los ovocitos se realizó con jeringa de 5ml y aguja de 18 ½ G, cargada previamente con Phosphated Buffer Saline modificado (PBS-M), adicionando suero de ternero inactivado y penicilina-estreptomicina (100.000 UI/L y

100mg/L respectivamente) (9). El contenido de los folículos se vertió en cajas de Petri grande (90 mm) y posteriormente con microscopio estereoscópico se identificaron y clasificaron de acuerdo a la calidad del cúmulo y las características del citoplasma (10). Para la coloración de los complejo cúmulo-ovocito (CCOs) se establecieron 3 grupos: 512 de excelente calidad (Categoría A), 503 de muy buena calidad (Categoría B) y 439, carentes de células del cúmulo con citoplasma uniforme (Categoría C). Así mismo, los CCOs que presentaron signos de degeneración, tanto en el citoplasma como en las células del cúmulo fueron descartados. Mediante pipeta Pasteur de punta afinada fueron transferidos a cajas de Petri chicas (35mm) conteniendo PBS-M, procediéndose a sucesivos lavados (9).

Coloración con MTT

Para evaluar la viabilidad se utilizó la incubación con MTT, según el método descrito por Mosmann en 1983. El MTT (Sigma) es disuelto en PBS-M a una concentración de 5mg/ml, y posteriormente filtrado (solución madre).

Los CCOs se colocaron individualmente mediante pipeta Pasteur de punta afinada en cada cava de una placa de ELISA-96 con 10 ul de la solución madre de MTT en 100 ul de PBS-M e incubaron durante 4 horas a 37° C, 5 % de CO₂ y

99 % de humedad. El MTT al ser reducido por las enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias cambia de incoloro o débilmente amarillento a azul oscuro debido a la formación de un precipitado de formazan. Después de la incubación, los CCOs fueron observados en microscopio óptico, evaluados y clasificados. Según la respuesta de los CCOs observada, se clasificaron como positivos en aquellos que presentaron cambio en la coloración y como negativo donde no se manifestó dicho cambio. Dentro de los positivos, se realizó una subclasificación en: débil, moderada o intensa, de acuerdo al grado de valoración subjetiva por la intensidad de la respuesta de la coloración.

Evaluación Estadística

Se realizó el test de Chi cuadrado con la corrección de Pearson para evaluar los resultados obtenidos expresados en las diferentes tablas.

RESULTADOS

Se describe en los Cuadros 1 y 2 los resultados obtenidos de la coloración de MTT según las diferentes categorías de CCOs. Es destacable que a mayor calidad en los CCOs existe un mayor porcentaje que presentan coloración positiva y a menor calidad existe un mayor porcentaje de coloración negativa. Estos resultados son altamente significativos

Cuadro 1. Resultados de la coloración de MTT según las diferentes categorías de ovocitos.

Categoría	Coloración negativa	Coloración débil	Coloración moderada	Coloración intensa	Total
A	34 (6.6)	32 (6.3)	114 (22.3)	332 (64.8)	512
B	105 (20.8)	112 (22.3)	151 (30.1)	135 (26.8)	503
C	197 (44.9)	148 (33.7)	70 (15.9)	24 (5.5)	439
Total	336	292	335	491	1454

Cuadro 2. Comparación de los resultados negativos y positivos de la coloración de las categorías A y B agrupadas con la categoría C.

	Coloración Negativa	Coloración Positiva	Total
A y B	139 (23.1)	876 (76.9)	1015
C	197 (44.9)	242 (55.1)	439

con el test de Chi² con la corrección de Pearson ($P < 0.000$). Según los resultados obtenidos, se observó claramente que los CCOs de la categoría A presentan mayoritariamente una coloración positiva intensa (64.8%) y solamente se observó un 6.6% de coloración negativa.

En los CCOs de categoría B se observó un 79.2% de coloración positiva (débil: 22.3%, moderada: 30.1% e intensa: 26.8%) y se observó un 20.8 % de coloración negativa. En los CCOs de la categoría C se observó solamente un 55.1% de coloración positiva, donde mayoritariamente presentan coloración débil (débil: 33.7%, moderada: 15.9 e intensa: 5.5%). En ésta categoría se observó una proporción muy alta de ovocitos con coloración negativa (44.9%).

Además se realizó la comparación de resultados entre las categorías que normalmente se seleccionan para maduración y fertilización *in vitro* (categorías A y B) con la categoría que normalmente se descartan (categoría C) tomando exclusivamente la respuesta a la coloración positiva (sin discriminar) y negativa (tabla II). Los resultados de las categorías A y B mostraron claramente ser altamente significativos por el test de Chi² con la corrección de Pearson ($P < 0.000$) con los resultados en la categoría C.

DISCUSIÓN

Los eventos ocurridos durante la maduración de los ovocitos influyen significativamente en su capacidad de fertilizar y desarrollar a embriones transferibles o congelables (1). El sistema de cultivo debe imitar el final de los eventos de la ovogénesis que ocurre durante el período periovulatorio (11, 12).

La maduración *in vitro* de la totalidad de los ovocitos en diferentes medios de cultivo aún no ha sido posible, sin embargo existe una alta correlación entre la calidad del ovocito y la habilidad en la maduración de su núcleo, así como de la distribución de sus organoides en el citoplasma (3,10). Además de la integridad del ovocito, resulta de gran importancia la presencia de las células de cúmulos,

las que establecen una verdadera cooperación metabólica posibilitando el pasaje de nutrientes hacia el ovocito (5).

En un temprano estudio citológico se plantea que la mayoría de los folículos antrales están sufriendo el proceso de atresia (12). Hsueh *et al.* (1994) plantean que del 70-99,9% de los folículos sufren el proceso de atresia durante toda la vida reproductiva de las hembras mamíferas (8). Este proceso se da en todas las etapas de la foliculogénesis, desde la formación de las células germinales hasta la finalización del desarrollo folicular. La etapa crucial la constituye el pasaje de folículo preantral a antral, donde degeneran la mayor parte de estos folículos. Silván *et al.* (1993) describe que el proceso de atresia es posible estudiarlo por dos alternativas: criterios morfológicos y endocrinos (15). Estudiando poblaciones de ovocitos por criterios endocrinos encontró entre 3 y 23 % de ovocitos atresicos en ovocitos seleccionados para maduración *in vitro*.

La utilización de criterios morfológicos ha sido muy utilizada para describir el proceso de atresia de ovocitos (2, 7, 17) describen que configuraciones anormales de la cromatina están ampliamente correlacionadas con el proceso de atresia. Duby *et al.* (1995), plantean que con ovocitos obtenidos de terneras pre-púberes, obtuvo en un 12% de ellos configuraciones anormales de la cromatina después de la maduración *in vitro*, y 10% en la fertilización *in vitro* (4). Según este autor esto indicaría una maduración nuclear incompleta. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro laboratorio, que muestran un porcentaje de 10-15% de ovocitos de las categorías A y B que presentan ciertos grados de atresia frente a las técnicas de control de rutina con coloraciones histológicas. Una de las causas de atresia lo constituye la alteración de la integridad de las mitocondrias o de su sistema de cadenas enzimáticas (16). Según los datos obtenidos en nuestro experimento con la coloración de MTT y en relación a la calidad de los CCOs, se demuestra que a mayor

calidad morfológica de los CCOs se observa mayor respuesta positiva, y a su vez mayor intensidad en la coloración. Esta respuesta a la coloración del MTT está probablemente relacionado con la integridad funcional de las mitocondrias de los ovocitos.

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

La utilización de la coloración de MTT para evaluar la viabilidad de los CCOs con características similares a los utilizados en programas de maduración y fertilización *in vitro* puede ser altamente beneficiosa, teniendo en cuenta estos resultados de correlación significativa entre los aspectos morfológicos de los CCOs y su comportamiento frente al MTT. Los resultados de nuestro experimento, nos permitieron establecer la existencia de un 23.1% de CCOs de las categorías A y B de los ovocitos utilizados con capacidad limitada para la maduración *in vitro* debido posiblemente a alteraciones en el sistema enzimático de las mitocondrias. Además podemos agregar que también existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos según el grado subjetivo (intensidad de color: débil, moderada e intensa) entre las tres categorías de CCOs. Cabe destacar las diferencias estadísticas significativas observadas entre los CCOs de la categoría A y B con los CCOs de categoría C en los grados de intensidad de color de la respuesta a la técnica utilizada.

La evaluación morfológica como forma de clasificar y determinar la calidad de los complejos cúmulos-ovocitos que puedan ser utilizados en programas de maduración y fertilización *in vitro* requieren de la incorporación de técnicas, cuya estandarización determinen aspectos de su funcionalidad o integridad estructural.

Agradecimientos

Al Dr. Fernando Vila por el asesoramiento en la evaluación estadísticas de los resultados. Al Dr. Ignacio Lago por su evaluación crítica del presente trabajo.

Referencias Bibliográficas

1. **Bavister, B.D.; Rose-Hellekant, T.A.; Pinyopummintr, T.** (1992). Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37:127-146.
2. **Cognié, Y.; Poulin, N.; Pisselet, C.; Monniaux, D.** (1995). Effect of atresia on the ability of follicular fluid to support developmental competence of sheep oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 43:188.
3. **Damiani, P.; Fissore, R.A.; Cibelli, J.B.; Robl, J.M.; Duby, R.T.** (1995) Evaluation of cytoplasmic maturation of calf oocytes. *Theriogenology* 43:191.
4. **Duby, R.T.; Damiani, P.; Looney, C.R.; Long, C.R.; Balise, J.J.; Robl, J.M.** (1995). Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology* 43:202.
5. **García, J. M.; Pinheiro, L. E. L.; Almeida Júnior, I. L.; De Lima, V. F. H.; Mikich, A. B.** (1988). Estudos con maturacao *In vitro* de oócitos bovino em meios quimicamente definidos. *Ars Veterinaria* 27:69-75.
6. **Gordon, I.; Lu, K.H.** (1990). Production of embryos *in vitro*: Its impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.
7. **Guilbault, L.A.; Rouillier, P.; Matton, P.** (1995). *In vitro* release of estradiol and level of atresia of subordinate follicles collected during the growing of regressing phase of follicular dominance in cattle. *Theriogenology* 37:218.
8. **Hsueh, A.J.W.; Billig, H.; Tsafiriri, A.** (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15: 707-253.
9. **Larocca, C.; Romano, J.E.; Calvo, J.; Lago, I.; Fila, D.; Roses, G.; Viqueira, M.; Kmaid, S.; Imai, K.** (1997). Relation between bulls and semen preparation on *in vitro* produced bovine embryos. *Journal of Mammalian Ova Research* 14:139-142.
10. **Leibfried, L.; First, L.** (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 48. 76-86.
11. **Leibfried-Rutledge, M.L.; Critser, E.S.; Eyestone, W.H.; Northey, D.L.; First, N.L.** (1987). Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction* 36: 376-383.
12. **Leibfried-Rutledge, M.L.; Critser, E.S.; Parrish, J.J.; First, N.L.** (1989). *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31:61-74.
13. **Morgan, D.M.** (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods of Molecular Biology* 79:179-183.
14. **Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
15. **Silván, G.; Illera, J.C.; Illera, M.J.; Lorenzo, P.; Illera, M.** (1993). Percentage of atretic and non atretic follicles in different follicular size of heifers and cows. *Theriogenology* 39:311.
16. **Stojkovic, M.; Machado, S.A.; Stojkovic, P.; Zakhartchenko, V.; Hutzler, P.; Goncalves, P.B.; Wolf, E.** (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, 64: 904-909.
17. **Williams K.A.; Hinrichs K.** (1996). Morphology and meiotic competence of oocytes in relation to follicle atresia in the mare. 13th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia. Vol: 3, P17-4.