

RESUMEN

En nuestro laboratorio siempre se ha trabajado con la finalidad de conseguir el máximo número de blastocistos posibles a partir de ovocitos recuperados de cabras prepúberes sacrificadas en matadero. La población ovocitaria recuperada de estas hembras suele ser muy variable, debido básicamente a factores fisiológicos. Por este motivo, los ovocitos deben seleccionarse cuidadosamente con el fin de utilizar en el procedimiento de producción *in vitro* de embriones sólo aquellos capaces de madurar *in vitro*, se fecundados y mantener el desarrollo embrionario. Hasta el momento, la selección realizada en nuestro laboratorio se basaba en criterios morfológicos, seleccionando sólo los ovocitos de gran tamaño, con citoplasma homogéneo y rodeados de varias capas compactas de células del cumulus. Sin embargo, el porcentaje de blastocistos obtenidos a partir de los ovocitos seleccionados siguiendo estos criterios ha sido bajo, y no se ha conseguido superar el 10% (Izquierdo et al., 1999). Esta tesis, por lo tanto, nació de la necesidad de encontrar marcadores que pudieran indicarnos la competencia del ovocito, de modo que podamos distinguir los ovocitos competentes para el desarrollo del resto de ovocitos que no son capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto.

Los dos primeros trabajos de esta tesis, que podemos englobar dentro de un gran bloque, tiene como objetivo estudiar el papel que juegan la expresión de las subunidades del MPF (Maturation Promoting Factor), la Ciclina B1 y la p34^{cdc2}, así como su actividad kinasa, y la acumulación de RNA y proteínas en los ovocitos con la adquisición de competencia para el desarrollo. Las técnicas utilizadas para evaluar estos parámetros son técnicas invasivas, de modo que los ovocitos analizados no pueden ser utilizados posteriormente para continuar el desarrollo embrionario. Por lo tanto, era necesario relacionar las características moleculares estudiadas con un parámetro que nos permitiera seleccionar los ovocitos de forma visual. En estos trabajos el parámetro no invasivo escogido fue el diámetro ovocitario, ya que en numerosas especies se ha observado que existe una relación

positiva entre la capacidad del ovocito para dar lugar a un embrión viable y el diámetro folicular (bovino: Furher et al., 1989; caprino: Crozet et al., 1995; porcino: Marchal et al., 2002), y éste, a su vez, se correlaciona con el diámetro ovocitario (bovino: Arlotto et al., 1996; caprino: Crozet et al., 2000; de Smedt et al., 1994). De este modo, los ovocitos de cabras prepúberes recuperados de matadero fueron divididos en 4 grupos según su tamaño: <110 µm, 110-125 µm, 125-135 µm y >135 µm (de Smedt et al., 1994). Estos ovocitos fueron madurados y fecundados *in vitro*, y los embriones resultantes fueron cultivados *in vitro* para comprobar la competencia ovocitaria de cada grupo de tamaño. A su vez, se evaluó el estadio nuclear de una muestra de ovocitos de cada grupo antes y después de la MIV. El estudio de expresión de las subunidades del MPF se realizó mediante RT-PCR y Western blot para la p34^{cdc2}. Además, se cuantificó la cantidad de proteínas y de RNA acumulados en ovocitos de cada grupo mediante el método de Lowry modificado y por espectrofotometría, respectivamente. Los resultados mostraron que en el momento de recoger los ovocitos de los folículos, la mayoría ya había reanudado la meiosis, y esta proporción era mayor a medida que aumentaba el diámetro ovocitario. Además, los ovocitos de mayor tamaño fueron los que alcanzaron mayor porcentaje de maduración nuclear tras la MIV, tuvieron mayor tasa de fecundación normal, de división embrionaria a las 48 h post-fecundación, y dieron lugar al mayor porcentaje de blastocistos. Nuestros resultados mostraron que los ovocitos de mayor diámetro, que eran los más competentes, no diferían del resto de grupos estudiados en cuanto a la expresión de ARN y ARNm de p34^{cdc2}, de ARNm de Ciclina B1 y de proteína total, antes y después de la MIV; por el contrario, sí observamos mayor niveles de ARN total acumulado y de ARN de Ciclina B1 después de la MIV, mayor nivel de proteína p34^{cdc2} y de actividad del complejo MPF. Por lo tanto, nuestros resultados indicaron que la competencia para el desarrollo estaba relacionada con el MPF, sugiriendo un posible papel de este complejo en la maduración citoplasmática.

El tercer trabajo surgió a raíz de los resultados obtenidos en los primeros estudios. Nos sorprendió observar que la mayoría de ovocitos

hubieran reanudado la meiosis en el momento de recuperarlos de los folículos. Los ovocitos sólo reanudan la meiosis en el interior de los folículos como respuesta al estímulo hormonal de la LH, previo a la ovulación, o bien debido a un proceso de degeneración o atresia. Nuestros estudios se realizan en hembras prepúberes, todavía no maduras hormonalmente, de modo que nos planteamos la posibilidad de que los ovocitos que estábamos recogiendo estuviesen sufriendo un proceso más o menos avanzado de atresia, que posiblemente pudiera interferir en los resultados de desarrollo embrionario. La realización del tercer estudio se realizó en la Universidad de Gante, donde utilizaban técnicas de detección de apoptosis de modo rutinario, y se usaron ovocitos bovinos debido a la imposibilidad de disponer de ovocitos caprinos. La finalidad de este trabajo fue aprender las técnicas de tinción con Annexin V y TUNEL mediante la realización de un estudio de apoptosis en ovocitos bovinos, células del cumulus y blastocistos según el diámetro ovocitario. Para ello, los ovocitos recuperados de matadero se clasificaron en tres grupos de tamaño: $<110 \mu\text{m}$, $110\text{-}120 \mu\text{m}$ y $>120 \mu\text{m}$ (Fair et al., 1995). Los ovocitos fueron madurados y fecundados *in vitro*, y los embriones fueron cultivados durante 6 días más. Una muestra de ovocitos y células del cumulus fueron usados para evaluar apoptosis antes y después de la MIV mediante Annexin V y TUNEL. El resto de los ovocitos fueron fecundados *in vitro* y continuaron el proceso de desarrollo embrionario, y los blastocistos resultantes también fueron evaluados con las mismas técnicas. En este estudio la capacidad para el desarrollo embrionario se conseguía en los ovocitos $>110 \mu\text{m}$. Los resultados obtenidos indicaron que el porcentaje de ovocitos inmaduros que mostraban signos de apoptosis disminuía en los ovocitos $>110 \mu\text{m}$. Además, el porcentaje de ovocitos apoptóticos se redujo claramente durante la maduración *in vitro*. Por el contrario, la apoptosis en las células del cumulus aumentó con la maduración. Por último, los blastocistos obtenidos mostraron menor incidencia de apoptosis en estadio tardío en los ovocitos de mayor diámetro evaluado mediante Annexin V, pero no mediante TUNEL. A partir de estos resultados llegamos a la conclusión que las diferencias de desarrollo embrionario observadas entre ovocitos de diferente tamaño no podían ser

explicados únicamente por una diferencia en la incidencia de apoptosis entre diámetros.

Por último, el cuarto y quinto trabajo pretendían evaluar la apoptosis en ovocitos caprinos de diferente diámetro mediante las dos técnicas utilizadas en el estudio anterior. En estos trabajos quisimos introducir un parámetro más a tener en cuenta, además del diámetro ovocitario, y por ello clasificamos nuestros ovocitos también según criterios morfológicos en dos grupos: los que no mostraban signos de atresia, es decir, que presentaban el cumulus compacto y el citoplasma homogéneo; y aquellos que presentaban signos de atresia temprana, es decir, con el cumulus ligeramente expandido y/o el citoplasma del ovocito heterogéneo. Pensamos que era interesante introducir el parámetro de la morfología porque podría ser utilizado como criterio predictivo de la calidad de los embriones resultantes. Para ello, los ovocitos fueron clasificados por diámetro siguiendo los criterios explicados en el primer trabajo, y por morfología según los parámetros anteriormente mencionados. Al igual que en el anterior estudio, la apoptosis fue evaluada en ovocitos y células del cumulus antes y después de la maduración, y en los blastocistos obtenidos. En estos estudios, al igual que el realizado en bovino, también observamos una disminución de la apoptosis en los ovocitos y un incremento en las células del cumulus durante la maduración *in vitro*. En general, se observó que los ovocitos de mayor diámetro y de morfología sana presentaban menos incidencia de apoptosis, aunque los resultados obtenidos difirieron según la técnica utilizada. No se detectaron diferencias en cuanto a incidencia de apoptosis en los blastocistos obtenidos a partir de ovocitos de diferente diámetro. Por último, pudimos observar que la capacidad para el desarrollo embrionario no dependía sólo del diámetro del ovocito, sino también de su morfología. Por lo tanto, pudimos concluir que la apoptosis sí puede influenciar la capacidad para el desarrollo del ovocito, pero no la calidad del blastocisto obtenido.

SUMMARY

In our laboratory, we have always worked in order to achieve as many blastocysts as possible from oocytes obtained from slaughtered prepubertal goats. Oocyte population recovered from these females use to be very variable, basically due to physiological factors. For this reason, we must select oocytes very carefully in order to use only the oocytes capable to mature *in vitro*, be fertilized and maintain embryonic development. So far, selection performed in our laboratory was based on morphological criteria, and we only selected large oocytes that were surrounded by several layers of compact cumulus cells and had homogeneous cytoplasm. However, the blastocyst rate obtained using the oocytes selected with that criteria has been low, and we have not achieved more than 10% (Izquierdo et al., 1999). This thesis, as a consequence, was born because we needed to find some markers of oocyte competence, so we could distinguish developmental competent oocytes from the rest of oocytes incapable to develop until blastocyst stage.

The aim of the first two works of this thesis, which can be grouped into one chapter, was to study the role that plays the expression of the subunits of MPF (Maturation Promoting Factor), Cyclin B1 and p34^{cdc2}, MPF kinase activity and the storage of RNA and proteins in oocytes in the acquisition of developmental competence. The methods used to evaluate these parameters were invasive ones, and therefore the oocytes evaluated could not longer be used to continue the subsequent embryonic development. As a consequence, it was necessary establish a relationship between the molecular characteristics studied with a parameter that allowed us to select the oocytes visually. Oocyte diameter was chosen as non-invasive parameter, because a relationship between oocyte competence to develop into a viable embryo and follicular diameter has been observed in many species (bovine: Furher et al., 1989; caprine: Crozet et al., 1995; porcine: Marchal et al., 2002) and the follicular diameter has been also related to oocyte diameter (bovine: Arlotto et al., 1996; caprine: Crozet et al., 2000; de Smedt et al., 1994). That way, prepubertal goat oocytes recovered from the slaughterhouse were divided in

four groups depending on their diameter: <110 μm , 110-125 μm , 125-135 μm and >135 μm (de Smedt et al., 1994). These oocytes were matured and fertilized *in vitro*, and the resulting embryos were cultured to evaluate the developmental competence of each diameter group. At the same time, nuclear stage was assessed from a sample of oocytes of each diameter group before and after IVM. MPF subunits expression was studied by RT-PCR and Western blot for p34^{cdc2}. In addition, the protein and RNA stored were quantified in each diameter group by the Lowry method modified and by spectrophotometry, respectively. Results showed that, at collection time, most of the oocytes had already resumed meiosis, and this proportion was higher with increasing oocyte diameter. Moreover, the biggest oocytes reached nuclear maturation after IVM in a higher percentage, they showed higher percentage of normal fertilization, cleavage after 48 h post-insemination, and they produced the higher blastocyst rate. Our results showed that the largest oocytes, that were the most competent ones, did not differ from the rest of the groups in terms of p34^{cdc2} RNA and mRNA, Cyclin B1 mRNA and total protein before and after IVM; however, we observed higher levels of total stored RNA and Cyclin B1 after IVM, higher level of p34^{cdc2} protein and of MPF activity. Consequently, our results indicated that oocyte developmental competence was related to MPF, suggesting a role of this factor in cytoplasmic maturation.

The third work was arisen due to the results obtained in the first work. It surprised to us to observe that most of oocytes had resumed meiosis at collection time. Oocytes can resume meiosis inside the follicle as a consequence of the LH hormonal stimulus, prior ovulation, or due to a degeneration process or atresia. Our works were performed in prepubertal females, which were hormonally immature, so we raised the possibility that we were using oocytes suffering a process of atresia, which probably could impair our embryonic development results. The third study was conducted in the University of Gent, where they used techniques of detection of apoptosis in a routine way, and we used bovine oocytes due to the impossibility to obtain caprine oocytes. The aim of this study was to learn the techniques of

Annexin V staining and TUNEL by the accomplishment of a study of apoptosis in bovine oocytes, cumulus cells and blastocysts depending on oocyte diameter. For this purpose, oocytes obtained from the slaughterhouse were classified in three groups of size: $<110 \mu\text{m}$, $110\text{-}120 \mu\text{m}$ y $>120 \mu\text{m}$ (Fair et al., 1995). Oocytes were matured and fertilized *in vitro*, and the resulting embryos were culture for additional 6 days. A sample of oocytes and cumulus cells were used to assessed apoptosis before and after IVM by means of Annexin V staining and TUNEL. The rest of the oocytes kept on developing, and the resulting blastocysts were also evaluated with the same techniques. In this study, oocyte developmental competence was achieved in oocytes higher than $110 \mu\text{m}$. Our results showed that the percentage of immature oocytes showing signs of apoptosis decreased in oocytes $> 110 \mu\text{m}$. In addition, the proportion of apoptotic oocytes was reduced clearly during IVM. On the contrary, apoptosis in cumulus cells increased during maturation. Finally, the blastocysts obtained showed less incidence of late apoptosis in the biggest oocytes when evaluated by means of Annexin V, but not by means of TUNEL. From these results we could conclude that differences observed in different diameter groups in terms of embryonic development could not be explained only because a differential incidence of apoptosis among diameter groups.

Finally, the purpose of the fourth and fifth studies was to evaluate apoptosis in goat oocytes of different diameter by means of the two techniques used in the previous work. We wanted to introduce a new parameter in these studies, in addition to oocyte diameter, and so we classified the oocytes by morphological criteria as well: the ones that did not show any sign of atresia, that is, oocytes that had compact cumulus cells layers and homogeneous cytoplasm, and the ones that showed early signs of atresia, that is, oocytes with heterogeneous cytoplasm and/or cumulus cells with initial expansion. We believed that it would be more interesting to introduce the morphological classification because it could be use as a predictive parameter of the quality of the resulting embryos. For that purpose, oocytes were classified by diameter following the criteria explained in the first work, and by morphology following the criteria explained before.

Like in the previous study, apoptosis was evaluated in oocytes and cumulus cells before and after in vitro maturation, and in the blastocysts obtained. Like in bovine, we also observed in this study a decrease of apoptosis in oocytes and an increase in cumulus cells during IVM. In general, it was observed that the biggest oocytes with healthy morphology showed fewer incidences of apoptosis, although the results obtained differed depending on the technique used. Finally, we could observe that oocyte developmental competence did not only depend on oocyte diameter, but also in COC morphology. Consequently, we could conclude that apoptosis can affect oocyte developmental competence, but not blastocyst quality.