

NOTABREVE

## UTILIZACIÓN DEL AZUL TRIPÁN PARA DIFERENCIAR OVOCITOS BOVINOS VIVOS Y MUERTOS EN FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

USE OF TRYPAN BLUE TO DETERMINE VIABILITY OF BOVINE OOCYTES FOR *IN VITRO* FERTILIZATION

Filipiak, Y.<sup>1\*</sup> y Larocca, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotecnología de la Reproducción. Facultad de Veterinaria. UdelaR. Montevideo. Uruguay.  
\*yael.filipiak@fvet.edu.uy

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Tinción.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Stain.

### RESUMEN

Se estudió la tinción supravital con azul tripán (AT) para diferenciar ovocitos inmaduros bovinos vivos y muertos. Es importante conocer la viabilidad de los ovocitos para descartar los muertos antes de la fertilización *in vitro* (FIV). Se puncionaron folículos menores de 6 mm de ovarios provenientes de matadero. Los complejos cúmulo ovocitos (COC), se clasificaron en A, B y C. Se consideraron los de calidad A y B. Se formaron 2 estratos (otoño-invierno y primavera-verano) y 4 grupos dentro de cada estrato: un grupo control (GC), el cual no se sometió al AT y tres grupos: G1, G2, G3 que se sometieron al AT por 2, 5 y 10 minutos, respectivamente. Los COC teñidos de azul (muertos), se descartaron, los vivos se cultivaron 22 h para maduración y se volvieron a someter al AT, respetando los mismos tiempos de exposición. Se realizó la inseminación y se controló el desarrollo hasta mórulas compactas para evaluar la posible incidencia del AT y de las estaciones del año. En conclusión, la tinción con AT hasta 10 minutos, es útil para diferenciar ovocitos vivos y muertos sin producir efectos deletéreos.

### SUMMARY

The supravital stain with tripan blue (AT) was used for differentiating live bovine immature oocytes from dead ones. It is important to know the viability of the oocytes, in order to discard the dead ones before the *in vitro* fertilization (FIV). Smaller than 6 mm follicles were punctured, from ovaries obtained from an abattoir. The cumulus oocyte

complexes (COC) were classified as A, B or C. Only those of quality A or B were taken into account. Two categories were formed (autumn-winter and spring-summer) and 4 groups within each category were considered: a control group (CG), which was not stained with AT and three groups: G1, G2 and G3 stained with AT for 2, 5 and 10 minutes, respectively. Blue stained COC (dead) were discarded, live COC were cultured for 22 h in a maturation culture and were stained again, maintaining the same exposure times. Insemination was then performed and compact morules counted, in order to evaluate the effect of AT and season. In conclusion, AT stain can be used up to 10 minutes to differentiate live and dead oocytes, without any deleterious effect on the gametes.

### INTRODUCCIÓN

El AT es una tinción supravital que se utiliza para determinar la viabilidad de células (Manual Merck KGaA, 2004). Existen antecedentes de su uso en diferentes especies, pero la información en bovinos es escasa (Coelho *et al.*, 1998). Existen datos del uso de AT en células germinales fetales (Kato y Tsunoda, 1996); en folículos preantrales (Jewgenow y Stolte, 1996); ovocitos de hamsters (Lewin *et al.*, 1990); ovocitos de búfalo (Gupta *et al.*, 2002).

Conocer la viabilidad del óvulo, sería muy útil para hacer más eficiente la FIV. Investigaciones sugieren que de los COC

Recibido: 17-2-11. Aceptado: 13-4-11.

Arch. Zootec. 61 (234): 309-312. 2012.

fertilizados *in vitro*, aproximadamente un 54% son fecundados (Larocca *et al.*, 2004). Este estudio determina la proporción de COC inmaduros muertos, los cuales no se van a fertilizar, por lo cual sería de utilidad como medida rutinaria en la FIV.

El objetivo general de este trabajo fue diferenciar ovocitos vivos y muertos mediante la aplicación del AT, seleccionando los vivos, que pueden ser fecundados y evolucionar a embriones; determinando también, el efecto de las estaciones sobre la viabilidad de los COC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se trasladaron ovarios provenientes de vacas de matadero con menos de 5 horas de faenadas, en solución salina isotónica a 37°C. Los COC se obtuvieron de folículos de 2 a 6 mm de diámetro (Liebfried y First, 1979) aspirando con jeringa y aguja hipodérmica 18G, en medio buffer fosfato salino modificado (m-PBS), con 5 % de suero fetal bovino (SF) y antibióticos (Larocca *et al.*, 2004). Los COC se transfirieron a placas de Petri de 90 mm de diámetro, con m-PBS, sobre platina caliente a 37°C y se lavaron en m-PBS. Se clasificaron bajo microscopio estereoscópico (40x) y seleccionaron para el experimento los de calidad A y B, según el criterio de Liebfried y First (1979).

La muestra total fue de 1092 COC, de los cuales 529 fueron recolectados en otoño-invierno y 563 en primavera-verano. Estos periodos se consideraron estratos (1 y 2; respectivamente). Se dividió los COC en 4 grupos de similar número en ambos estratos: grupo control (GC) no se trató con AT; los otros 3 fueron sometidos al AT al 0,16 % en m-PBS por tiempos crecientes: grupo 1 (G1): 2 minutos; grupo 2 (G2): 5 minutos y grupo 3 (G3): 10 minutos.

Los COC se colocaron en gotas de m-PBS con AT el tiempo correspondiente y se lavaron en m-PBS. Se observaron para verificar su color. La totalidad de los ovocitos del GC y los vivos de los grupos G1, G2 y G3,

se lavaron 2 veces con medio de maduración TCM-199 Hepes + 5% de SF + 10% de licor folicular bovino (LFb) y antibióticos. Se colocaron en gotas cubiertas con aceite mineral y se cultivaron 22 h en incubadora (38°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 90-95% de humedad relativa), para su maduración.

Después de la maduración se realizó una nueva tinción de forma similar a los ovocitos inmaduros, utilizando AT al 0,16% en TCM-199. Se sometió a FIV a los COC vivos de todos los grupos y a al GC.

La FIV se realizó con el fin de evaluar los efectos de diferentes tiempos de exposición al AT sobre el desarrollo embrionario en los grupos y estratos. Después de la maduración, los COC se inseminaron con semen previamente lavado y capacitado (3 millones de espermatozoides/mL), en medio BO (Brackett y Oliphant, 1975), en gotas cubiertas con aceite mineral. Se cultivaron por 5 h en incubadora.

Después de la inseminación, se removieron los cúmulos con micro pipeta automática. Se lavaron 2 veces en el medio de desarrollo (CR1aa) y se traspasaron a gotas de cultivo con este medio, cubiertas con aceite mineral, Controlándose la división cada 48 h hasta mórulas compactas.

Se realizaron los análisis estadísticos de acuerdo a las hipótesis: para detectar diferencias entre el número de muertos inmaduros entre los periodos otoño-invierno y primavera-verano, se realizó un test de diferencia de proporciones. Para el análisis de desarrollo a mórulas compactas en los diferentes estratos y grupos, se realizó un test de Mantel Hanzel (MH) (tablas de contingencia estratificado 2xn). El análisis para muertos posmaduración no se realizó debido al reducido tamaño de la muestra. En todos los casos se trabajó a un nivel de significación del 5%. Los análisis se realizaron con R Development Core Team, R.F.F.S.C. (2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró una diferencia significativa

## AZUL TRIPÁN PARA DIFERENCIAR OVOCITOS BOVINOS VIVOS Y MUERTOS

( $p=0,02$ ) entre la proporción de muertos en los diferentes estratos, siendo mayor la proporción de muertos en otoño-invierno (0,202) que en primavera-verano (0,128). El test de MH ( $\chi^2_{MH\text{ global}}=8,82$ ;  $p=0,03$ ) muestra que hay una interacción moderada entre las estaciones y uno o varios tratamientos. El G3 difiere significativamente ( $p=0,04$ ) de los demás grupos, presentando mayor desarrollo en el estrato primavera-verano. Esto concuerda con la fisiología ovárica bovina en las distintas estaciones del año (Holy, 1970). De acuerdo a la estadística, manteniendo los COC inmaduros 10 minutos (G3) en AT existe asociación positiva con el desarrollo embrionario, comparando con los otros grupos, en los que no se encontraron diferencias significativas.

Un estudio realizado por Calvo *et al.* (2004) utilizando MTT para evaluar la viabilidad de los COC A y B, encontraron un 23,1% de COC inviábiles. En esta investigación, de 810 COC A y B (G1, G2 y G3), 131 estaban muertos (16,2%), al igual que Calvo *et al.* (2004), se demostró la importancia de

conocer los ovocitos inmaduros inviábiles para la FIV.

Gupta *et al.* (2002), utilizando el AT en ovocitos de búfalo, concluyeron que la exposición 2 minutos resultaba la más adecuada. No obtuvieron diferencias significativas en clivaje y embriones desarrollados. Los resultados indican una diferencia significativa a favor del G3 (10 minutos). Estos resultados se asemejan a los de Gupta, pero difieren en especie, concentración y en el tiempo óptimo de exposición al AT. Lo cual indicaría que el AT no tiene efectos adversos en la maduración y desarrollo a mórulas compactas.

Se puede concluir que la tinción con AT en ovocitos bovinos inmaduros podría ser valiosa como rutina en la FIV, ya que se eliminan COC muertos antes de pasar a la etapa de maduración.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de la Dra. Raquel Correa.

### BIBLIOGRAFÍA

- Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*, 12: 260-274.
- Calvo, J., Pérez, B., Fila, D. y Campos, E. 2004. Evaluación de la viabilidad de ovocitos bovinos mediante la utilización de 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide. *Rev Soc Med Vet (Uruguay)*, 39: 7-10.
- Coelho, L.A., Esper, C.R., Alvarez, R.H., Vantini, R., Almeida-Jr, I.L. and Liguori, A.C. 1998. Assessment of viability of bovine embryos produced *in vitro* by using trypan blue dye. *Ars Vet*, 14: 277-284.
- Gupta, P.S.P., Ravindranatha, B.M., Nandi, S. and Sarma, P.V. 2002. Trypan blue staining to differentiate live and dead buffalo oocytes and its effect on embryo development *in vitro*. National Institute of Animal Nutrition and Physiology. Bangalore. Karnataka.
- Holy, L. 1970. Biología de la reproducción bovina. Ciencia y Técnica. La Habana, Cuba. pp: 55-56.
- Jewgenow, K. and Stolte, M. 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. *Anim Reprod Sci*, 44: 183-193.
- Kato, Y. and Tsunoda, Y. 1996. Low temperature preservation of mouse fetal germ cells at 4°C. *Theriogenology*, 45: 1029-1035.
- Larocca, C., Calvo, J., Lago, I., Roses, G. y Viqueira, M. 2004. Diferentes fuentes de líquido folicular en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos. *Arch Zootec*, 53: 329-332.
- Lewin, A., Tal, Z., Zohav, E. and Schenker, J.G. 1990. Ultrarapid freezing and thawing of hamster oocytes: morphological parameters, trypan blue staining and sperm penetration assay for evaluating survival. *J Reprod Med*, 35: 136-140.
- Liebfried, L. and First, N.L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci*, 48: 76-86.
- Manual Merck, KGaA. 2004. 64271. Darmstadt. Alemania. Microscopía. 1.11732 Azul Tripán

FILIPAKYLAROCCA

(C.I. 23850). <http://pb.merck.de/servlet/PB/show/1288950/111732es.pdf> (18/12/2008).  
R Development Core Team, R.F.F.S.C. 2008. R: A

Language and Environment for Statistical  
Computing. Vienna Austria R Foundation for  
Statistical Computing 1, 2673.