

## **Efecto de la vitrificación sobre la sobrevivencia de ovocitos bovinos madurados *in vitro***

### **Effect of vitrification on the survival of *in vitro* matured bovine oocyte**

Landinez, J<sup>1</sup>; Baez, F<sup>2</sup>; Pirela, A<sup>2</sup>; Villamediana, P<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Central de Venezuela. Postgrado en Producción Animal. Maracay-Venezuela.

<sup>2</sup>Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Laboratorio de Citogenética. Maracaibo-Venezuela

#### **Resumen**

El principal objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que causa la vitrificación de ovocitos madurados *in vitro* y el tipo de técnica utilizada para tal fin sobre la sobrevivencia ovocitaria, medida por evaluaciones morfológicas y por progresión meiótica. Para esto, se diseñó un experimento completamente al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Designando como grupo control a ovocitos sin vitrificación, tratamiento 1 ovocitos vitrificados por la técnica pajueta estirada abierta (OPS) y el tratamiento 2 ovocitos vitrificados por la técnica de microgota (MG). Presentándose una tasa de sobrevivencia del 98% en el grupo control, y de 91,42 y 88,63% en los tratamientos de vitrificación (OPS y MG). Estos resultados fueron comprobados con una tinción vital de yoduro de propidio. La tasa de maduración *in vitro* se observó en un rango del 46-63. El porcentaje de ovocitos degenerados fue mayor en el grupo vitrificado por la técnica OPS. Los resultados de este trabajo permiten corroborar que la técnica de vitrificación es eficaz para conservar ovocitos bovinos.

#### **Introducción**

En las últimas décadas, la criopreservación de embriones y ovocitos ha sido una herramienta útil para interrumpir y controlar el ciclo reproductivo de especies de interés zootécnico, sometiendo dichos embriones y ovocitos a temperaturas bajas, interrumpiendo su ciclo celular, manteniendo su viabilidad y funcionalidad (Fuku *et al.*, 1995).

Los métodos de criopreservación se pueden clasificar según el tiempo de congelación y descongelación, en criopreservación lenta, rápida o ultrarrápida y vitrificación (Shaw *et al.*, 2000). Pudiendo ser la vitrificación la técnica más práctica para la criopreservación de ovocitos bovinos, aunque se han encontrado resultados negativos en cuanto a la sobrevivencia ovocitaria causados por las bajas temperaturas (Fuku *et al.*, 1995).

Los efectos de las bajas temperaturas y la formación de hielo en los sistemas biológicos son los aspectos de mayor importancia para la supervivencia de los organismos que son sometidos a la criopreservación. El principal factor biofísico de destrucción durante el proceso de criopreservación es la formación de hielo intracelular que puede ser evitado por una adecuada deshidratación de la célula, por eso se reduce el agua intracelular, pudiendo limitar el daño del proceso de criopreservación (Fabbri *et al.*, 2000).

Shaw *et al.* (2000) señalan entre los principales daños celulares causados por la criopreservación a la ruptura de membranas celulares, pérdidas o ganancias cromosómicas, poliespermia, falla en la extrusión del cuerpo polar, apoptosis del DNA, deshidratación y pérdidas de las funciones de proteínas y enzimas, endurecimiento y fracturas de la zona pelúcida.

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto que causa la vitrificación de ovocitos madurados *in vitro* y el tipo de técnica utilizada para tal fin sobre la sobrevivencia ovocitaria, medida por evaluaciones morfológicas y por progresión meiótica.

#### **Materiales y Métodos**

##### *Obtención, selección y maduración de ovocitos*

Se utilizaron ovarios de vacas mestizas, sacrificadas en mataderos comerciales, estos ovarios se transportaron al laboratorio en solución buffer fosfato (PBS) a una temperatura de 35-37 °C en un contenedor isotérmico. Posteriormente, fueron lavados en PBS + 50 mg/L de gentamicina a 35-37 °C. Los ovocitos se extrajeron por la técnica de *slicing*, seleccionando los ovocitos que presentaron un mayor tamaño, un citoplasma homogéneo y al menos una capa completa de células del cúmulus compacta (Villamediana, 1998).

Una vez seleccionados los complejos ovocitos-cúmulus (COC's) se cultivaron en grupos de 12, en microgotas de 50 µl cubiertas con aceite mineral (69794, Fluka) durante 24 horas a 38,5 °C en una atmósfera

con 5% CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad, utilizando el medio de cultivo tisular 199 (TCM-199, M-7528, Sigma) suplementado con 275 mg/L de piruvato sódico (815990, Fluka), 50 mg/L de gentamicina, 146 mg/L de L-glutamina (G-15120, Sigma), 10 µg/mL de Folltropin-V® (Vetrepharm, Canadá Inc), 1 µg/mL de 17β-estradiol (E8875-25G, Sigma) y 10 % suero fetal bovino (SFB, F-2442, Sigma) (Men *et al.*, 2003).

#### *Vitrificación de Ovocitos Maduros*

Una vez madurados, los COC`s que presentaron citoplasma homogéneo y al menos una capa completa de células del cúmulo, fueron sometidos a una solución vitrificadora e inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido durante al menos una semana. Cumplido este lapso, se descongelaron y se colocaron en el medio de maduración para valorar la sobrevivencia morfológica.

##### *a) Solución Vitrificadora y Desvitrificadora*

Los COC`s seleccionados, se lavaron en PBS suplementado con SFB al 10 %, posteriormente fueron transferidos y equilibrados por 10 minutos en una solución vitrificadora, la cual consistió de 1,8 M de etilenglicol (EG), 0,1 M de sacarosa, 10 % de SFB en PBS. Para la descongelación se utilizó una solución desvitrificadora compuesta por 0,5 M de sacarosa en PBS y 10 % SFB, donde se colocaron los ovocitos por 10 minutos, finalmente los COC`s fueron lavados en medio TCM-199 + 10 % de SFB, y transferidos al medio de maduración (Asada y Fukui, 2000).

##### *b) Técnica de Vitrificación en Pajuela Estirada Abierta (OPS)*

Se utilizaron pajuelas de 0,25 ml, estas se colocaron en una plancha de calentamiento a 90 °C, durante 30 segundos, para ablandar el plástico permitiendo estirar la pajuela por ambos extremos de manera horizontal, logrando disminuir su diámetro interno a la mitad del inicial. Posteriormente se cortaron en los extremos más delgados y se esterilizaron con etanol al 70 % y luz ultravioleta. Se cargaron a la pajuela por capilaridad, 10 COC`s contenidos en 20 µl de solución crioprotectora (Hurt *et al.*, 2000).

##### *c) Técnica de Vitrificación en Microgota (MG)*

Se utilizó la técnica descrita por Kim *et al.*, 2007 con algunas modificaciones, la cual consistió en dejar caer en nitrógeno líquido 20 µl de solución vitrificadora, la cual contenía 10 COC`s madurados *in vitro*, este volumen al congelarse forma una esfera que inmediatamente se colocó en un tubo criogénico de 20 µl y se almacenó sumergido en nitrógeno líquido.

#### *Diseño Experimental*

Para evaluar el efecto de la vitrificación por OPS y MG sobre la sobrevivencia ovocitaria y la progresión meiótica, se diseñó un experimento completamente al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones, asignando grupos de 50 COC`s madurados *in vitro* a los siguientes tratamientos, tratamiento control, utilizando COC`s sin vitrificar, tratamiento 1, COC`s vitrificados a través de la técnica OPS y tratamiento 2, COC`s vitrificados a través de la técnica de MG.

Se consideraron ovocitos degenerados los que presentaron forma irregular, membrana celular rota o citoplasma contraído (Otoi *et al.*, 1995). La sobrevivencia ovocitaria, se determinó sobre la integridad de la membrana, zona pelúcida y citoplasma después de la desvitrificación. Esta clasificación morfológica se validó a través del microscopio estereoscópico, y se confirmó a través de una tinción vital con yoduro de propidio a una concentración de 0,2 mg/ml en PBS (Men *et al.*, 2003). Los ovocitos fueron examinados en microscopio de fluorescencia con un filtro de 610 nm para captar la emisión del yoduro de propidio, considerándose como viables los que no pudieron ser penetrados por el yoduro de propidio.

Para la evaluación de la Progresión Meiótica, los ovocitos fueron despojados de las células del cúmulo mediante agitación mecánica y fijados en una mezcla de metanol-ácido acético en proporción 3:1 durante al menos 24 horas a 4°C y se tiñeron con aceto-orceína al 1.1%. Luego se evaluó la maduración nuclear en un microscopio óptico (400X), clasificándolos según el estadio meiótico alcanzado en: maduros (MII o Telo I) o inmaduros (anafase I, metafase I, condensación cromosómica y VG). Aquellos ovocitos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los grupos anteriormente nombrados fueron clasificados como degenerados.

#### *Análisis Estadístico*

Las variables discretas: tasa de sobrevivencia y progresión meiótica fueron analizadas por medio de las pruebas de  $\chi^2$  bajo la aplicación del procedimiento logístico (*Proc Logistic*) del paquete estadístico del SAS®, y se consideraron diferencias significativas  $P < 0.05$ .

### **Resultados y Discusión**

En la Tabla 1 se presentan las tasas de sobrevivencia morfológica de ovocitos bovinos madurados *in vitro* y sometidos al proceso de vitrificación. A pesar de no encontrarse diferencias significativas entre los grupos experimentales, la mayor sobrevivencia morfológica se observó en el grupo control (98%), seguida

por los tratamientos OPS y MG (91,42 y 88,63 %, respectivamente). Los tratamientos sometidos a vitrificación presentaron mayor cantidad de ovocitos degenerados.

Estos resultados se confirmaron evaluando la integridad de la membrana plasmática del ovocito con una tinción de yoduro de propidio, en donde se encontró que el 81,57 % de los ovocitos del grupo control presentaban la membrana plasmática intacta, mientras que los tratamientos vitrificados (OPS y MG) presentaron 66,66 y 64,28 % de membranas intactas.

Los resultados del presente estudio coinciden con los observados por Men *et al.*, (2003) en donde se encontraron altas tasas de sobrevivencia ovocitaria al proceso de vitrificación, tasas estas comprobadas por pruebas de integridad de membrana. No obstante Rodríguez *et al.*, (2004) encontraron tasas de sobrevivencia ovocitaria menores al aplicar tratamiento de vitrificación en ovocitos maduros.

Tabla 1. Sobrevivencia morfológica de ovocitos bovinos madurados *in vitro* y vitrificados por MG y OPS

Grupo Experimental	% Sobrevivencia Morfológica	
	Óptimos	Degenerados
Control	98	2
Pajuela Estirada Abierta	91,42	8,57
Microgota	88,63	15,37

En la tabla 2 se presentan los resultados de progresión meiótica para ovocitos bovinos madurados *in vitro* y vitrificados, donde se evidencia una tasa de maduración ovocitaria similar entre los diferentes grupos experimentales, la cual varía entre un rango de 46 – 63 %. El mayor porcentaje de ovocitos degenerados se encuentra en el tratamiento de vitrificación por OPS, mientras que el grupo control y el tratamiento de vitrificación por MG presentaron resultados similares.

La tasa de maduración encontrada en el grupo control (sin vitrificación) es similar a la observada por Rodríguez *et al.* (2004) y Martino *et al.* (1994), los cuales presentaron tasas de maduración alrededor del 55 %. El éxito limitado de la tasa de maduración alcanzada en este trabajo puede ser atribuido a las imperfecciones del medio de cultivo utilizado para la maduración ovocitaria, ya que las condiciones *in vitro* nunca llegan a ser completamente adecuadas para el desarrollo óptimo del ovocito. Mientras que el porcentaje de ovocitos degenerados puede ser atribuido al daño causado por la criopreservación.

Tabla 2. Progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro* y vitrificados por MG y OPS.

Grupo Experimental	Ovocitos		
	Maduros (%)	Inmaduros (%)	Degenerados (%)
Control	52,77	30,55	16,66
Pajuela Estirada Abierta	63,15	10,52	26,31
Microgota	46,15	38,46	15,38

### Conclusión

La técnica de vitrificación de ovocitos bovinos permite conservar fuentes genéticas para su posterior utilización en programas de mejoramiento genético. La prueba de integridad de la membrana permite valorar de una manera menos subjetiva la sobrevivencia morfológica de ovocitos bovinos madurados *in vitro*.

### Literatura Citada

- Asada, M. y Y. Fukui. 2000. Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 54: 889-898.
- Fabbri, R., E. Porcu, T. Marsella, M. Primavera, G. Rocchetta, P. Ciotti, O. Magrini, R. Seracchioli, S. Venturoli, y C. Flamigni. 2000. Thechnical aspects of Oocyte Cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 169: 39- 42.
- Fuku, E., L. Xia, y B. Downey. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 32: 139- 156.
- Hurt, A., F. Landim-Alvarenga, G. Seidel y e. Squires. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open – pulled straws. *Theriogenology* 54: 119-128.

- Kim, D., H. Park, S. Kim, I. Hwang, B. Yang, G. Im, H. Chung, H. Seang, S. Moon y B. Yang. 2007. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. *Journal of Reproduction and Development*. On Line ISSN: 1348-4400.
- Martino, A., M. Palomo, T. Mogas and M. Paramio. 1994. Influence of the collection technique of prepubertad goat oocyte on in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 42: 859-873.
- Men, H., R. Monson, J. Parrish, y J. Rutledge. 2003. Degeneration of cryopreserved bovine oocyte vía apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology* 47: 73- 81.
- Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, y T. Suzuki. 1995. *In vitro* Fertilization and Developmental of Immature and Mature Bovine Oocyte Cryopreserved by Ethylene Glycol with Sucrose. *Cryobiology* 32: 455-460.
- Rodriguez, B., J. Molina, y P. Villamediana. 2004. Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. *Ciencia* 12(2): 125-136.
- Shaw, J., A. Oranratnachai, y A. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59-72.
- Villamediana, P. 1998. Embriones caprinos producidos *in vitro*: Estudio citogenético y ultraestructural de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* Tesis Doctoral en Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, España. 172 p.