

Desarrollo partenogenético *in vitro* con ovocitos vitrificados bovinos **In vitro parthenogenetic development with bovine vitrified oocytes**

***Ruiz, J^{1,2}; Correa J¹.**

1. Instituto de Reproducción Animal -Universidad Austral de Chile.

2. Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Huancavelica - Perú.

jarube2801@gmail.com

Resumen

El objetivo fue evaluar el uso de ovocitos vitrificados bovinos en la producción *in vitro* de embriones partenogenéticos. Fueron activados partenogenéticamente 76, 119 y 142 ovocitos vitrificados, expuestos y no expuestos en una solución de vitrificación con 35% de etilenglicol, 5% de polivinilpirrolidona y 0,4 M de Trehalosa. Las tasas de división fueron 55,3%, 72,3% y 74,6%; y desarrollo hasta blastocitos fueron 7,1%, 17,4% y 21,7% con ovocitos vitrificados, expuestos y no expuestos en la solución vitrificante respectivamente. Estos resultados demuestran que es posible producir embriones partenogenéticos *in vitro* utilizando ovocitos bovinos vitrificados.

Palabras claves: Vitrificación, ovocitos, partenogénesis, bovinos

Abstract

The objective was evaluate the use of bovine vitrified oocytes in the *in vitro* production of parthenogenetic embryos. Were parthenogenetically activated 76, 119 y 142 vitrified, exposed and non-exposed oocytes in a solution of vitrification with 35% ethylene glycol, 5% polyvinyl-pyrrolidone and 0,4M Thehalose. The rates of cleavage were 55,3%, 72,3% and 74,6%; and development to blastocysts were 7,1%, 17,4% and 21,7% with vitrified, exposed and non-exposed oocytes in the solution of vitrification respectively. These results demonstrate that is possible *in vitro* production of parthenogenetic embryos with bovine vitrified oocytes.

Key words: Vitrification, oocytes, parthenogenesis, bovines

Introducción

La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectantes y ovocitos o embriones con el nitrógeno líquido (Rall y Fahy, 1985). La solución vitrificante utilizada posee crioprotectores en alta concentración que al ser enfriados no cristaliza, sino se torna viscosa y pasa del estado líquido al sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de allí su nombre (Rall y Fahy, 1985). Las ventajas de la vitrificación sobre la congelación tradicional es que evita la formación de cristales de hielo, disminuye el daño causado por el enfriamiento, no requiere equipos caros ni sofisticados y es sencilla de realizar (Cando, 2005). Las soluciones de vitrificación contienen una mezcla de crioprotectantes permeables y no permeables. Los agentes permeables son solutos orgánicos responsables de la protección de los organelos intracelulares de las células durante el congelamiento y el calentamiento antes y después del almacenamiento en nitrógeno líquido. Etilenglicol, dimetilsulfoxido y polietilenglicol son comúnmente usados (Begin y col., 2003). Los crioprotectantes no permeables son macromoléculas y azúcares como polivinilpirrolidona, sucrosa y trehalosa, cuyo rol es reducir la formación de hielo durante el congelamiento, facilitar la deshidratación de las células antes del enfriamiento y proteger la membrana celular (Begin y col., 2003). La óptima concentración de los crioprotectantes, su tasa de permeabilidad y toxicidad dependen de la especie, el tipo de célula a criopreservar y el estado de desarrollo si se trata de un embrión.

El interés en la criopreservación del ovocito ha aumentado con la creciente importancia en la producción de embriones *in vitro*, la transferencia nuclear y el almacenamiento de información en los bancos de genes (Dinnyés y col., 2000). Por otro lado el corto tiempo que un ovocito permanece viable y el limitado número de ovocitos que pueden ser colectados en un día cualquiera, hacen que el éxito de la criopreservación de ovocitos en mamíferos sea de gran interés para la investigación básica y la aplicación comercial (Albarracín y col., 2005). De este modo los ovocitos de algunas especies de mamíferos han sido criopreservados satisfactoriamente a través de procedimientos de congelamiento lento o vitrificación, pero las tasas posteriores de fertilización y desarrollo son mucho mas bajas que aquellas obtenidas usando ovocitos frescos (Albarracín y col, 2005). La activación partenogenética de ovocitos representa una herramienta válida para evaluar la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* y para la identificación de un protocolo óptimo para la activación del ovocito requerido para el éxito de tecnologías avanzadas tales como la clonación por transferencia nuclear (Gasparini, 2004). Por estos motivos el objetivo fue evaluar las tasas de sobrevivencia, segmentación (división) y de blastocistos de ovocitos bovinos vitrificados maduros y activados para la producción de embriones partenogenéticos.

Materiales y Métodos

Complejos cúmulo-ovocito (COCs) de ovarios bovinos procedentes del matadero FRIVAL de Valdivia-Chile fueron recuperados con una aguja 18 G y una jeringa de 10ml en el laboratorio del Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, dentro de las 4 horas siguientes al sacrificio de los animales. El líquido folicular con los COCs recuperados fueron depositados en un tubo Falcon de 50cc que reposaba en baño María a 37° C donde se dejó decantar por 20 minutos. Se aspiró el sedimento con una pipeta Pasteur y se depositó en placas Petri para ser diluido en medio SOF-HEPES (NaCl 107,7 mM, KCl 7,16 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1,19 mM, CaCl₂·2H₂O 1,71 mM, MgCl₂·2H₂O 0,49 mM, NaHCO₃ 37 mM, Rojo fenol (0,5%), Hepes 25 mM, Piruvato de Na 0,33 mM, L-glutamina 1 mM, Glucosa 1 mM, Glicina 5 mM, Taurina 5 mM, Lactato de Na 60% 3,3 mM, BME 50x, MEM 100x, Insulina 10µg/ml, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, BSA 1mg/ml). Los COCs seleccionados bajo una lupa estereoscópica fueron madurados *in vitro* a 38,5 °C por un lapso de 20-22 horas en estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO₂ al aire en un medio de maduración TCM -199 (modificado con Hepes) suplementado con piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml, estradiol 17-β 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%. Después de la maduración, los COCs fueron sometidos a vórtex por 3 minutos en un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía solución de PBS adicionada de hialuronidasa al 0,1%, luego los ovocitos fueron lavados 3 veces en SOF-HEPES y se seleccionaron solamente los ovocitos que se encontraban en metafase II con un visible primer corpúsculo polar, considerados ovocitos maduros. Luego los ovocitos maduros fueron suspendidos en un medio de equilibrio (SVI) consistente de 4% etilenglicol (EG) en solución base (BV) compuesta por TCM 199 HEPES suplementado con 20% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina por 15 minutos en una placa calentada a 39° C. Luego, los ovocitos se colocaron en una solución de vitrificación (SVII) consistente de 35% EG, 5% de polivinilpirrolidona y 0,4M trehalosa (TRE) en BV por 30 segundos. Posteriormente utilizando una micropipeta p10, microgotas de 3,5 µl de SVII conteniendo 4 - 6 ovocitos fueron goteadas sobre una superficie de papel de aluminio pre-enfriado flotando en nitrógeno líquido. Luego, las microgotas vitrificadas fueron transferidas hacia un vial criogénico de plástico preenfriado de 2 ml y fueron almacenadas en nitrógeno líquido durante 1-3 días hasta su uso. Posteriormente para descongelar los ovocitos, fueron expuestos a una solución de TRE 0,3M en BV por 5 minutos sobre una placa caliente a 39° C y luego los ovocitos fueron transferidos a BV. Basado en una evaluación morfológica los ovocitos sobrevivientes a la criopreservación fueron seleccionados de acuerdo a la integridad de la membrana, la zona pelúcida y ooplasma homogéneo. Los ovocitos dañados por la solución de vitrificación fueron separados. Finalmente, los tratamientos experimentales evaluados fueron: ovocitos vitrificados y sobrevivientes a la criopreservación, ovocitos expuestos a las soluciones vitrificantes (control de toxicidad de crioprotectantes) y un grupo control de ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes. Estos 3 grupos experimentales fueron activados para producir embriones partenogenéticos, utilizando ionomicina de Ca más 6-DMAP de acuerdo al protocolo propuesto por Gatica (2004). Los ovocitos vitrificados, expuestos y no expuestos fueron cultivados en SOF-HEPES adicionado de 5 µM de ionomicina de Ca por 5 minutos y después cultivados en una gota de m-SOF adicionada de 2 mM de 6-DMAP por 5 horas. Concluidos los tratamientos para la activación artificial, los ovocitos fueron cultivados por 8 días en m-SOF y se colocaron en estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% de CO₂ al aire. Se evaluó la tasa de división a las 48 horas y de blastocistos a los 8 días de cultivo en los ovocitos vitrificados, expuestos a las soluciones vitrificantes y el grupo control de ovocitos no expuestos. Se evaluaron 7 réplicas por tratamiento. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron comparados utilizando análisis de varianza (ANOVA) después de la transformación arcsen.

Resultados y Discusión

Se obtuvo 55,1% (76/138) de ovocitos morfológicamente normales después del descongelamiento de los ovocitos vitrificados (Tabla 1). Si bien en este trabajo no se alcanzó las tasas de sobrevivencia de 88,1 ± 2,1% y 77-86%, reportadas por Atabay y col. (2004) y Dinnyes y col. (2000) respectivamente; se pudo obtener un porcentaje de 55,3 % (Tabla 1) de división a los 2 días y de 7,1% de blastocistos (Tabla 1) a los 8 días de evaluación, demostrando que están funcionalmente viables. Además dichos autores evaluaron la sobrevivencia de los ovocitos inmediatamente después del descongelamiento y en este trabajo se hizo a los 2 días después de la activación al momento de la evaluación de la división. Se obtuvo 93,7% (119/127) de ovocitos morfológicamente normales después de la exposición a las soluciones crioprotectantes (control de toxicidad) (Tabla 1). Resultados similares reporta Dinnyes y col. (2000) quien obtuvo 94% de ovocitos sobrevivientes cuando expuso ovocitos bovinos a la misma solución crioprotectante utilizada en este experimento. Para la producción de embriones partenogenéticos se activaron 76 ovocitos vitrificados, 119 ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectantes y 142 ovocitos no expuestos (Tabla 1). Al análisis de varianza se obtuvieron diferencias estadísticas significativas a las 48 horas de la activación para la producción de embriones partenogenéticos (Tabla 1). Los ovocitos expuestos y no expuestos (72,3% y 74,6% respectivamente) a las soluciones crioprotectantes obtuvieron una mayor tasa de división comparado con los

ovocitos vitrificados (55,3%). Resultados similares de división (56,0%) a los reportados en este experimento obtuvo Dinnyes y col. (2000) cuando activó ovocitos bovinos vitrificados, asimismo reportó 69% y 79% de división de los ovocitos expuestos y no expuestos a las soluciones crioprotectantes, muy similares también a los obtenidos en este experimento. Por otro lado, a los 8 días de la activación se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en las tasas de blastocistos (Tabla 1). Con los ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes se obtuvo 21,7% de blastocistos y fue estadísticamente superior a los blastocistos (7,1%) obtenidos con los ovocitos vitrificados. No se encontraron diferencias estadísticas entre la tasa de blastocistos obtenidos con los ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectantes (17,4%) y la tasa de blastocistos obtenidos con los ovocitos vitrificados (7,1%). Al respecto, Dinnyes y col. (2000) obtuvieron 11%, 25% y 26% de blastocistos cuando activaron ovocitos bovinos vitrificados, ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectantes y ovocitos no expuestos respectivamente, siendo tasas de blastocistos relativamente superiores a las reportadas en este experimento, sin embargo esto puede explicarse por las diferentes condiciones de cultivo en ambos experimentos; 5% de CO₂ en este experimento frente a una mezcla de gases conformada por 5% CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, utilizada por Dinnyes y col. (2000). Finalmente podemos decir que es factible criopreservar ovocitos bovinos maduros, asimismo se puede afirmar que las soluciones crioprotectantes no son tóxicas para los ovocitos ya que no afecta la tasa de división ni la tasa de blastocistos partenogénicos. Por otro lado estos resultados sugieren que pueden utilizarse ovocitos bovinos vitrificados para la fecundación in vitro y para la producción de embriones por transferencia nuclear. El éxito de la vitrificación de ovocitos abre la posibilidad de almacenar material genético de hembras de calidad para producir crías aún después de muertas las madres. La técnica de vitrificación de ovocitos además podría aplicarse para la criopreservación de ovocitos de animales en peligro de extinción como la vicuña y el guanaco.

Tabla 1: Desarrollo partenogénico de ovocitos bovinos maduros vitrificados, expuestos y no expuestos a una solución vitrificante.

Ovocitos	Nº	Normales Post-exposición	Activados (réplicas)	División a las 48 horas (%) *	Blastocistos a los 8 días (%) *
Vitrificados	138	76/138 (55,1 %)	76 (7)	42/76 (55,3) b	3/42 (7,1) b
Expuestos	127	119/127 (93,7%)	119 (7)	86/119 (72,3) a	15/86 (17,4) a,b
No expuestos	142		142 (7)	106/142 (74,6) a	23/106 (21,7) a

* Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas.

Conclusiones

Es posible obtener ovocitos bovinos morfológicamente normales luego de la vitrificación. La exposición de ovocitos a la solución de vitrificación no mostró reducción en la tasa de división y desarrollo de blastocistos partenogénicos. Es posible obtener blastocistos luego de la activación partenogénica de ovocitos bovinos morfológicamente normales luego de la vitrificación.

Literatura Citada

- Albarracín, J., Morató, R., Rojas, C. y Mogas, T. 2005.** Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertad and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 63: 890-901.
- Atabay, E.C., Takahashi, Y., Katagiri, S., Nagano, M., Koga, A., y Kanai, Y. 2004.** Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology* 61: 15-23.
- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A. y Keefer, C. 2003.** Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to-4 cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59: 1839-1850.
- Cando, J. 2005.** Evaluación de la sobrevivencia de embriones de coneja eclosionados, biopsiados y vitrificados por el método open pulled straw modificado. Tesis M Sc. en Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile.
- Dinnyés, A., Dai, Y., Jiang S., y Yang, X. 2000.** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. 2000. *Biology of Reproduction*. 63, 513-518.
- Gasparrini, B.; Boccia, L.; De Rosa, A.; Di Palo, R.; Campanile, G. y Zicarelli, L. 2004.** Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-partenogenetic development. *Theriogenology* 62: 1627 – 1637.
- Gatica, C. 2004.** Estudio de dos protocolos de activación y condiciones de cultivo sobre el desarrollo de embriones partenogénicos bovinos. Tesis Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile.
- Rall, W.F. y Fahy, G.M. 1985.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313 (6003) 573-575