ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 276-278

VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS DE TERNERA MADURADOS *IN VITRO*: EFECTO DE LA TÉCNICA OPS (*OPEN PULLED STRAW*) SOBRE EL CITOESQUELETO Y EL HUSO CROMOSÓMICO

Albarracín JL, Morató R, Rojas C, Palomo MJ, Izquierdo MD, Viniegra E y Mogas T

Unidad de Reproducción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

INTRODUCCIÓN.

Los ovocitos bovinos son mucho más difíciles de congelar que los embriones en los primeros estadios de desarrollo. Sus características morfológicas y funcionales tales como su tamaño, la naturaleza dinámica de sus organelas citoplasmáticas y el proceso bioquímico que realizan a lo largo de la meiosis y de unión al espermatozoide durante la fecundación son factores que pueden influir en la sensibilidad del ovocito a ser congelado.

Para ello se han desarrollado diferentes protocolos tanto de congelación lenta (1,2), rápida (3) y ultrarrápida (4) pero ninguno de ellos consigue resultados consistentes. Publicaciones recientes proponen la vitrificación como un buen método para la crioconservación de ovocitos (5)

Durante los procesos de congelación/descongelación se provoca daño en la estructura celular que puede afectar la posterior supervivencia del ovocito o su posterior fecundación y desarrollo embrionario. Diferentes autores describen efectos negativos de los procesos de congelación en la organización de huso comosómico de ovocitos humanos (6) y bovinos (7) así como en la distribución de los filamentos de actina de ovocitos bovinos(7).

En este trabajo, se estudió el efecto del protocolo de vitrificación OPS en la configuración del huso cromosómico, la configuración de los cromosomas y la distribución de los filamentos de actina de ovocitos de ternera madurados *in vitro* así como su efecto en la supervivencia y la capacidad de los ovocitos para ser fecundados y desarrollarse hasta los primeros estadios embrionarios.

MATERIAL Y MÉTODOS

Maduración, fecundación y cultivo embrionario *in vitro*. La maduración, la fecundación y el cultivo embrionario *in vitro* se realizaron según el protocolo descrito por Rizos et al. (2002). Brevemente, se recogieron ovarios de terneras en el matadero y se transportaron al laboratorio en PBS a 37ºC. Los ovocitos se obtuvieron mediante aspiración y se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban un citoplasma homogéneo con tres o más capas de células del cúmulus. La maduración se realizó en medio TCM 199 suplementado con un 10% de SFB y 10μg/ml de EGF durante 24 horas a 38,5ºC y con un 5% de CO_2 en aire.

Para la fecundación *in vitro*, los ovocitos fueron transferidos a 250 μl de medio de fecundación (Medio Tyrode suplementado con 25 mM Bicarbonato, 22 mM Na-lactato, 1 mM Na-Piruvato, 6 ng/ml albúmina sérica bovina y 10 μg/ml Heparina sódica). Los espermatozoides se obtuvieron tras la centrifugación de espermatozoides congelados/descongelados a través de un gradiente discontinuo de Percoll a 700g durante 8 minutos. Tras un recuento celular, se colocaron 250μl de la suspensión espermática junto con los ovocitos (concentración final:$1x10^6$ espermatozoides/ml) y se co-cultivaron a 38,5ºC y con un 5% de CO_2 en aire.

A las 24 horas post-inseminación (hpi), los presuntos zigotos fueron denudados y transferidos a microgotas de medio SOF suplementado con albúmina sérica bovina. Se evaluó el porcentaje de división celular a las 48hpi, contabilizando los embriones que se encontraban en el estadio de 2-4 células.

Vitrificación: A las 22 horas del inicio de la maduración *in vitro*, se vitrificaron los ovocitos mediante la técnica OPS. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Vajta et al. (1998). Brevemente, los ovocitos fueron parcialmente denudados y depositados en un medio TCM199-Hepes suplementado con un 20% de Suero Fetal Bovino (HM).A continuación, los ovocitos (grupos de 2 a 3) se colocaron en HM

suplementado con un 10% de Etilenglicol (EG) y un 10% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) durante 30 segundos. A continuación fueron transferidos a gotas de 20 µl de HM 0.5M de sacarosa y suplementado con un 20% de EG y un 20% de DMSO. Inmediatamente se realizaron gotas de 1 a 2 µl conteniendo los ovocitos que fueron introducidas en la pajuela de OPS por capilaridad y sumergidas en N_2 líquido. El tiempo entre el contacto de los ovocitos con los crioprotectores de mayor osmolaridad y el N_2 líquido fue inferior a 25 segundos. La descongelación se realizó sumergiendo la punta de la pajuela de OPS directamente en HM 0,25 M de sacarosa y equilibrados en este medio durante 5 minutos. A continuación se transfirieron a HM 0,15 M de sacarosa durante 5 minutos, luego a HM durante 5 minutos y finalmente fueron transferidos directamente al medio de maduración anteriormente descrito para que prosiguieran la maduración *in vitro* durante otras 2 horas más.

Para evaluar la citotoxicidad provocada por los distintos crioprotectores se siguió el procedimiento anteriormente descrito pero sin llegar a sumergir los ovocitos en N_2 líquido.

Inmunocitología. Antes de proceder a la fecundación se obtuvo una muestra de ovocitos madurados *in vitro* (control), otra muestra de los ovocitos que habían sido vitrificados y descongelados y una tercera muestra de los ovocitos expuestos a los distintos crioprotectores. Los ovocitos fueron denudados totalmente y fijados en Paraformaldehido al 2% en PBS, permeabilizados mediante el uso de Triton x-100 y posteriormente incubados con un anticuerpo monoclonal anti-α-tubulina durante 1 hora. Seguidamente se incubaron con Anti-mouse IgG antibody-Biotin durante 1 hora y avidina-CY5-FICT durante 30 minutos. Para la observación de la actina, los ovocitos fueron incubados con Faloidina-FITC durante 1,5 horas y para la observación de los cromosomas los ovocitos fueron incubados en Yoduro de Propidio durante 30 minutos. Entre las incubaciones los ovocitos fueron lavados tres veces en PBS durante 5 minutos.

El montaje se realizó sobre cubreobjetos tratados con Poly-L-Lisina y medio de montaje antifade (glicerol, n-propil-gallate y sodium azide en PBS). La localización de la tubulina, la actina y los cromosomas se realizó con un Microscopio de Escaneo Láser Confocal (Leica TCS 4D) provisto de un láser de Argón-Kriptón.

Análisis estadístico. La comparación estadística entre los grupos se llevó a cabo usando el test de χ^2 y se aceptaron diferencias significativas cuando $P \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la fecundación, un 28,7% de los ovocitos vitrificados/descongelados se encontraban en un estadio embrionario de 2 a 4 células, porcentaje que no difirió significativamente del 35,5% de división de los ovocitos sometidos a los diferentes concentraciones de crioprotectores. Sin embargo, ambos porcentajes fueron significativamente inferiores ($P<0,05$) al porcentaje de embriones obtenidos (87,2%) en condiciones control.

Tabla 1. División embrionaria a las 48 post-inseminación

	N	Embriones 2-4 cèl·lulas (%)
Control	149	130 (87,2)[a]
Citotoxicidad	93	33 (35,5)[b]
Vitrificación	87	25 (28,7)[b]

Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ($P<0,05$).

Por lo que se refiere al análisis inmunocitoquímico se consideró que el huso cromosómico era normal cuando presentaba una placa metafásica en forma de barril formada por microtúbulos ordenados y bien definidos, y los cromosomas repartidos en el ecuador de esta estructura; cambios parciales como podían ser microtúbulos organizados en forma de red, desorganizados o dispersos, o los cromosomas no condensados o desordenados fueron considerados anormales. La ausencia de los

microtúbulos o de los cromosomas se consideró como una tercera categoría. Tras el proceso de vitrificación, el porcentaje de ovocitos que presentaban husos anormales (38,1%) fue significativamente inferior (P<0,05) respecto a los que habían sido sometidos a citotoxicidad (69,2%) o al grupo control (83,3%). Sólo en el grupo ovocitos vitrificados se observaron ovocitos en los que el huso cromosómico estaba ausente. (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de la distribución de los microtúbulos y los cromosomas en los tres grupos experimentales

	N	Normal (%)	Anormal(%)	Ausente(%)
Control	12	10 (83,3)[a]	2 (16,7)[a]	0 (0)[a]
Citotoxicidad	13	9 (69,2)[b]	4 (30,8)[b]	0 (0)[a]
Vitrificación	21	8 (38,1)[c]	8 (38,1)[c]	5 (23,8)[b]

Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas (P<0,05).

Por lo que se refiere a la distribución de la actina, los ovocitos considerados normales presentaban la actina en forma de una banda definida y homogénea en la periferia del oolema. Aquellos que presentaron una distribución diferente a la anteriormente mencionada, como podía ser actina difusa, segmentada o ausente, fueron considerados anormales. Los ovocitos sometidos a vitrificación presentaron una disminución significativa (P<0,05) en la distribución normal de la actina comparada con los grupos de citotoxicidad y control (66,7 %, 92,3% y 91,6% respectivamente) (Tabla 3). El 23,7 % de estos ovocitos no presentaban ninguna banda de actina mientras que en el resto de ovocitos anormales se observó un banda de actina difusa o segmentada (4,8% en ambos casos).

Tabla 3. Análisis de la localización de la actina en los tres grupos experimentales

	N	Actina normal(%)	Actina difusa(%)	Actina segmentada(%)	Actina Ausente(%)
Control	12	11 (91,6)[a]	1 (8,4)[a]	0[a]	0[a]
Citotoxicidad	13	12 (92,3)[a]	0[b]	1 (7,7)[b]	0[a]
Vitrificación	21	14 (66,7)[b]	1 (4,8)[c]	1 (4,8)[b]	5 (23,7)[b]

Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas (P<0,05).

Los resultados anteriormente descritos indican que el protocolo de vitrificación mediante la técnica OPS provoca daños irreversibles en la configuración del huso cromosómico y en el citoesqueleto de los ovocitos de ternera, daños que se traducen en un significativo descenso del número de embriones tras la fecundación *in vitro* y que demuestran la necesidad de nuevos estudios para intentar evitar el daño celular durante los procedimientos de crioconservación de ovocitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lim JM et al. (1992) Theriogenology 37:351-61
2. Suzuki T et al. (1996) Cryobiology 33:515-24
3. Hochi S et al (1997) J mamm Ova Res 14;61-5
4. Martino A et al. (1996) Biol. Reprod 54:1059-69
5. Vajta, G et al. (1998) Mol Reprod Develop 51: 53-58.
6. Boiso, I et al. (2002). Human Reproduction 17(7): 1885-1891
7. Saunders KM y Parks JE (1999) Biol. Reprod 61:178-187