

# Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados

**Bellaliz E. Rodríguez Telles, Julia Barrio Molina y Patricia C. Villamediana Monreal**

Laboratorio de Citogenética. Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia

Recibido: 09-01-04 Aceptado: 05-05-04

## Resumen

El objetivo final de este estudio fue comprobar el efecto del estadio meiótico de ovocitos bovinos sobre la sobrevivencia morfológica y la progresión meiótica de los mismos luego de ser vitrificados, utilizando etilenglicol y sacarosa como crioprotectores. También se analizó el efecto de dicho protocolo en ovocitos congelados en estadio de metafase II (MII) en presencia o ausencia de células del cumulus. Para ello se llevó a cabo la vitrificación y posterior maduración *in vitro* de ovocitos recién liberados de sus folículos; también la vitrificación de ovocitos, rodeados o no de células del cumulus, luego de ser cultivados durante 27 horas. En ambos casos se evaluó la sobrevivencia morfológica y las configuraciones cromatínicas de los ovocitos. No se observaron alteraciones producto del proceso de maduración ovocitaria *in vitro*. La sobrevivencia morfológica de los ovocitos vitrificados en estadio de vesícula germinal (VG) fue superior a la de aquellos congelados luego de ser madurados *in vitro*. El grupo experimental de ovocitos inmaduros presentó un porcentaje mayor de ovocitos con configuraciones cromatínicas anormales que los vitrificados luego de ser madurados *in vitro*. La anomalía más frecuentemente observada fue la ausencia de huso meiótico. Los ovocitos rodeados de células del cumulus resistieron mejor el daño crioinducido que los ovocitos vitrificados en ausencia de dichas células. La presencia de las células del cumulus, no afectó la proporción de ovocitos con configuraciones cromosómicas anormales. Con el protocolo utilizado, se recomienda la vitrificación de ovocitos en estadio de MII cubiertos de células del cumulus.

**Palabras clave:** Bovinos; maduración *in vitro*; ovocitos; vitrificación.

## Morphological Survival and meiotic progression of vitrified bovine oocytes

### Abstract

The aim of this study was to demonstrate the effect of meiotic stage on morphological viability and meiotic progression of bovine oocyte vitrified using ethylene glycol and sucrose as cryoprotectants. The effect of that protocol in frozen metaphase II oocytes with or without cumulus was also analysed. For this, bovine oocyte immediately released from their follicles, were vitrified and then matured *in vitro*; also *in vitro* matured oocytes, surrounded or not by cumulus cells, were vitrified. In both cases, morphological survival and chromatin configurations of the

\* Autor para la correspondencia. E-mail: pcvmonreal@cantv.net; Fax: 0261-7591662, Teléfono: 0261-7523882.

oocytes were evaluated. Alterations produced by *in vitro* oocyte maturation were not observed. Morphological survival of the oocytes vitrified in germinal vesicle stage was higher than that observed in oocytes frozen after *in vitro* maturation (IVM). Experimental group comprising immature oocytes had a higher percentage of oocytes with abnormal chromatin configurations than that observed in oocytes vitrified after IVM. The most frequently observed abnormality was the absence of meiotic spindle. Oocytes surrounded by cumulus cells resisted better the cryoinduced injury than oocytes vitrified in absence of this cells. Presence of cumulus cells did not affect the proportion of oocytes with abnormal chromatin configurations. It is recommended vitrification of oocytes in meiotic II stage surrounded by cumulus cells when using this protocol.

**Key words:** Bovine; *in vitro* maturation; oocytes; vitrification.

### Introducción

En las últimas décadas se han realizado considerables esfuerzos en poner a punto los procedimientos de maduración (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos de animales domésticos. En muchas de estas especies ya se han obtenido animales vivos después de la transferencia a hembras receptoras de los embriones producidos *in vitro*. El uso de ovarios recogidos en matadero como fuente de ovocitos para la MIV permite la producción de embriones útiles para el desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías como son el clonaje y la transgenia, así como también la obtención de embriones a partir de hembras en etapas no reproductivas (1).

La utilización de métodos eficientes y seguros para producir embriones bovinos a partir de ovocitos madurados *in vitro* ha aumentado el interés por criopreservar ovocitos. Aunque ya se han obtenido nacimientos a partir de ovocitos criopreservados, el potencial de desarrollo de los mismos ha sido muy bajo (2).

La vitrificación proporciona una alternativa rápida y sencilla sobre los métodos de congelación convencionales. Dicho proceso evita el riesgo potencial de daño celular causado por la formación de hielo intracelular, pero la exposición a altas concentraciones de los agentes crioprotectores requeridos para el proceso puede originar citotoxicidad y alteraciones osmóticas, afectando adversamente el desarrollo del ovocito después de la criopreservación (3). La vitrificación ha

sido usada exitosamente para la criopreservación de embriones en varios estadios de desarrollo en ratones, ovejas y vacas (4) y para la criopreservación de ovocitos de ratón (5, 6). Recientemente, la vitrificación ha sido intentada en ovocitos bovinos (7-9), bubalinos (10), equinos (8) y ovinos (11).

Se ha comprobado que la sobrevivencia del ovocito después del proceso de criopreservación es dependiente de una combinación de factores biofísicos (12). Por otra parte, existen una serie de factores morfológicos que afectan tanto la progresión meiótica como la tasa de sobrevivencia de los ovocitos bovinos postcongelación. Entre ellos se encuentran las características del ovocito tales como su calidad y madurez, y la presencia o ausencia de células del cumulus.

La criopreservación de ovocitos en estadio de VG se ha propuesto como una alternativa a la congelación de ovocitos en MII, ya que en este estadio la cromatina del ovocito está descondensada, protegida por la membrana nuclear y no existen estructuras microtubulares organizadas en forma de huso, sensibles a las bajas temperaturas y a los agentes crioprotectores. Por lo tanto, estas características particulares del ovocito en estadio de VG presumiblemente le conferirían al mismo protección contra el daño crioinducido.

La importancia de la interacción de las células foliculares somáticas con el ovocito (complejo cumulus-ovocito) se relaciona con el control fisiológico de algunos pasos que

comprometen a la ovogénesis, entre los cuales se encuentra el crecimiento del ovocito, la progresión de la maduración meiótica y la formación y maduración de la zona pelúcida. Una característica importante de estas células radica en la conocida impermeabilidad de la membrana del ovocito a varios metabolitos de bajo peso molecular, como la colina y el inositol (13). Esta cooperación metabólica existente entre el ovocito y las células del cumulus cumple un papel importante en la reanudación de la meiosis. En la literatura, pocos investigadores han enfocado su atención sobre el efecto de la desnudación de las células del cumulus de los ovocitos antes de la criopreservación.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la criopreservación sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos, determinando la sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados en estadio de vesícula germinal (profase I) y luego de ser madurados *in vitro*. También se evaluó el efecto de la presencia de las células del cumulus al momento de la vitrificación sobre la sobrevivencia morfológica y la capacidad de maduración *in vitro* de los mismos.

## Materiales y Métodos

### Obtención, selección y maduración *in vitro* de los ovocitos:

Los ovocitos inmaduros utilizados fueron obtenidos a partir de ovarios recogidos en matadero y transportados al laboratorio en solución buffer fosfato (PBS) a 38,5°C en un contenedor isotérmico. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados en PBS+gentamicina a 38,5°C. Los complejo cumulus-ovocito fueron recuperados mediante el método de *slicing*, que consiste en cortar sucesivamente la superficie del ovario con una hoja de bisturí en una placa de Petri conteniendo medio TCM-199 (Hi-Media AT094) suplementado con 2,2 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>, 50 mg/L de gentamicina y 11,1 mg/L de heparina. Se seleccionaron aquellos ovocitos con más de

una capa compacta de células del cumulus y citoplasma homogéneo.

El medio de maduración fue el TCM199 (M7128, Sigma) suplementado con 275 mg/L de piruvato sódico, 50 mg/L de gentamicina, 146 mg/L de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma). Los complejos cumulus-ovocito fueron cultivados en grupos de 10, en microgotas de 50 µL de medio cubiertas con aceite mineral, durante 27 horas a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad (14).

### Criopreservación de los ovocitos

Se utilizó el procedimiento de vitrificación de ovocitos propuesto por Asada y Fukui (15), Fuku *et al.* (16) y Hochi *et al.* (17), con ciertas modificaciones. Previamente, los ovocitos fueron lavados tres veces en PBS con 10% de FBS, siendo luego transferidos y equilibrados por 10 min en la solución vitrificadora (1,8 M de etilenglicol, 0,1 M de sacarosa, 10% de FBS en PBS). A continuación fueron cargados en tubos criogénicos, colocándose de 10 a 15 ovocitos por tubo en 100 µL de solución vitrificadora, sumergiéndolos directamente en nitrógeno líquido por 1 min.

La descongelación se realizó en agua a 37°C durante 20 seg, después de un período de al menos 7 días de almacenamiento de los ovocitos en nitrógeno líquido, colocándolos luego en 0,5 M de sacarosa en PBS por 10 min, antes de ser transferidos al medio de maduración.

### Evaluación de la sobrevivencia ovocitaria

Una vez equilibrados, los ovocitos fueron examinados bajo microscopio estereoscópico considerándose que habían sobrevivido al proceso de vitrificación, aquellos que no presentaban lisis celular, con membrana celular intacta y citoplasma homogéneo. Los ovocitos que presentaban algún signo de degeneración, como ruptura de la membrana o citoplasma contraído u oscuro fueron desechados.

### Evaluación de la maduración *in vitro*

Para valorar la maduración *in vitro*, los ovocitos fueron desnudados de sus células del cumulus mediante agitación mecánica por 2 min. Luego se procedió a la fijación en una solución de etanol-ácido acético (3:1) durante al menos 24 horas a 4°C, siendo teñidos con aceto-orceína al 1,5%. Bajo microscopio óptico (x400) se evaluó la maduración nuclear. De acuerdo con las figuras meióticas observadas los ovocitos fueron clasificados como: vesícula germinal, condensación cromosómica I, condensación cromosómica II, metafase I, anafase I, telofase I y metafase II. Se clasificaron como degenerados aquellos ovocitos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los grupos anteriormente nombrados.

### Diseño experimental

Los ovocitos fueron clasificados en tres grupos experimentales:

- Grupo control: conformado por ovocitos madurados *in vitro* durante 27 horas.
- Ovocitos inmaduros: los ovocitos con cumulus recién liberados de los folículos se sometieron directamente al proceso de vitrificación. Luego de al menos una semana de almacenamiento en nitrógeno líquido, se procedió con el protocolo de maduración *in vitro*.
- Ovocitos madurados *in vitro*: los ovocitos madurados *in vitro*, fueron sometidos al proceso de vitrificación con y sin células del cumulus, siendo estos últimos desnudados antes de ser vitrificados; igualmente se almacenaron por una semana en nitrógeno líquido.

En todos los grupos experimentales se evaluó la progresión meiótica de los ovocitos, para descartar la inducción de anomalías por efecto de la maduración *in vitro* y por la técnica de criopreservación.

### Análisis estadístico

Las experiencias fueron repetidas 5 veces. Las diferencias en las tasas de sobrevivencia, progresión meiótica y degeneración de los ovocitos bovinos entre los diferentes grupos experimentales fueron comparadas utilizando un test de Chi-cuadrado, donde las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $P < 0,01$ .

### Resultados y Discusión

En este estudio se incluyó un total de 774 ovocitos. De los 200 ovocitos que fueron sometidos directamente al proceso de vitrificación en estadio de vesícula germinal, sobrevivieron al proceso de congelación-descongelación 172 ovocitos, los cuales fueron madurados *in vitro* bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente en la metodología, siendo evaluada la progresión meiótica de 108 ovocitos. De los 178 y 396 ovocitos madurados *in vitro* en el grupo control y en el grupo de ovocitos vitrificados con y sin células del cumulus, siendo analizadas las configuraciones cromatínicas de 127 y 207 ovocitos, respectivamente.

### Efecto del estadio meiótico de ovocitos bovinos sobre el proceso de vitrificación

Para estudiar la sobrevivencia morfológica de ovocitos bovinos vitrificados en estadio de vesícula germinal (VG) y madurados *in vitro* (MIV), se evaluaron un total de 502 ovocitos. En la Tabla 1 se muestran las tasas de sobrevivencia de los ovocitos bovinos en los distintos grupos experimentales sobre el proceso de congelación-descongelación.

La mayor tasa de sobrevivencia morfológica se encontró en los ovocitos vitrificados en estadio de VG (90,05%), observándose una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre la sobrevivencia de los ovocitos congelados en estadio de VG respecto a los congelados luego de la maduración *in vitro*. En esta clasificación se obtuvo un mayor número de ovocitos con citoplas-

Tabla 1  
Sobrevivencia morfológica (%) de ovocitos bovinos vitrificados en estadio de VG y MIV

	n	Sobrevivientes			Degenerado			
		Óptimos	Parcialmente denudados	Total	Morfología alterada	Rotos ZP vacía	Citoplasma degenerado	Total
VG	191	148 (77,49) <sup>a</sup>	24 (12,56)	172 (90,05) <sup>a</sup>	2 (1,05)	2 (1,05)	15 (7,85) <sup>a</sup>	19 (9,95) <sup>a</sup>
MIV	311	212 (68,17) <sup>b</sup>	23 (7,39)	235 (75,56) <sup>b</sup>	7 (2,25)	17 (5,47)	52 (16,72) <sup>b</sup>	76 (24,44) <sup>b</sup>

a,b: Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente distintos (P<0,01).  
VG: Vesícula germinal. MIV: Ovocitos madurados *in vitro*. ZP: Zona pelúcida.

ma contraído o degenerado en el grupo de madurados *in vitro*, como también la mayor tasa de degeneración (24,44%), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa (P<0,01) entre los grupos experimentales evaluados. En el grupo de ovocitos vitrificados en estadio de VG, la degeneración mayormente observada fue la de citoplasma degenerado.

Ovocitos en estadio de VG y MIV han sido criopreservados por un gran número de autores, utilizando bien sea protocolos de congelación lenta o congelación rápida, observándose grandes variaciones en los porcentajes de sobrevivencia obtenidos, con un rango que oscila entre 50% y 80%. Fuku *et al.* (18) y Men *et al.* (19), vitrificaron ovocitos en estadio de GVBD (ruptura de la vesícula germinal) y en MII, obteniendo una tasa de sobrevivencia mayor en el grupo de ovocitos en MII. Hurtt *et al.* (8), estudiando la vitrificación de ovocitos bovinos y equinos maduros e inmaduros, obtuvieron una tasa de sobrevivencia de 50% y 46% en bovinos, y de 33% y 36% en equinos, sin observarse diferencias estadísticas entre ambos grupos. Luna *et al.* (20), obtuvieron tasas de sobrevivencia morfológica similares en ovocitos vitrificados a las 0 y 22 horas de MIV (71,8% y 72,6%, respectivamente).

Coincidiendo con los resultados del presente estudio, Boiso (21) encontró diferencias estadísticas al comparar las tasas

de sobrevivencia entre ovocitos criopreservados por congelación lenta en estadio de VG y MII (73,3% y 55,7%, respectivamente).

Así, la diferencia encontrada en la sobrevivencia morfológica de ovocitos bovinos durante el proceso de congelación-descongelación difirió de acuerdo al estadio meiótico, siendo el estadio de VG el más apto para resistir ha dicho proceso con el protocolo utilizado en este estudio. Las características particulares del ovocito en estadio de VG, cromatina descondensada, protegida por la membrana nuclear y no existencia de estructuras microtubulares organizadas en forma de huso sensibles a las bajas temperaturas y a los agentes crioprotectores, presumiblemente le conferiría al mismo protección contra el daño crioinducido.

Para estudiar los efectos que ejerce el proceso de vitrificación sobre la progresión meiótica de ovocitos bovinos en estadio de VG y MIV, estos fueron clasificados según el estadio meiótico alcanzado en: maduros (MII+Telol) e inmaduros (anafase I, metafase I, condensación cromosómica II y en profase I). Aquellos ovocitos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los grupos anteriormente nombrados se clasificaron como degenerados. Se evaluaron un total de 442 ovocitos. En la Tabla 2 se muestra los resultados obtenidos luego de la evaluación de la progresión meiótica de los ovocitos en los distintos grupos experimentales.

Tabla 2  
Progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados en estadio de VG y MIV

	n	Maduros			Inmaduros				Degenerados	
		MII	TeloI	Total mad (%)	AnaI	MI	CCII	VG	Total inm (%)	(%)
Cx	127	66	1	67 (52,75) <sup>a</sup>	4	21	16	17	58 (45,67) <sup>a</sup>	2 (1,57) <sup>a</sup>
MIV	207	81	1	82 (39,61) <sup>a</sup>	5	42	11	6	64 (30,92) <sup>b</sup>	61 (29,47) <sup>b</sup>
VG	108	3	0	3 (2,77) <sup>b</sup>	0	0	0	7	7 (6,48) <sup>c</sup>	98 (90,74) <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>, valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente distintos ( $p < 0,01$ ).

VG: vesícula germinal. CCII: condensación cromosómica II. MI: metafase I. AnaI: anafase I. TeloI: telofase I. MII: metafase II.

En este estudio, el grupo control (ovocitos sin vitrificar) resultó en una tasa de maduración de 52,75%. Se han publicado diversos resultados en relación a la progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro*, encontrándose en la literatura que las tasas de maduración oscilan entre un 50% y un 80%. Martino *et al.* (23) obtuvieron un porcentaje de maduración de 56,9% por medio de la técnica de *slicing*. Luna *et al.* (20), obtuvieron una tasa de maduración de 80,3%, pudiéndose observar que estos valores difieren de los obtenidos en el presente estudio. El éxito limitado de la tasa de maduración obtenida en este trabajo, puede ser atribuido a las imperfecciones en el medio de cultivo utilizado para la maduración ovocitaria. Las condiciones *in vitro* nunca llegan a ser completamente adecuadas para el desarrollo óptimo del ovocito (24), por lo que se requiere que el medio de maduración sea suplementado con hormonas, factores de crecimiento, suero, etc. (11).

En el presente estudio, la mayoría de las configuraciones nucleares observadas en el grupo de ovocitos sin vitrificar, fueron definidas como normales, encontrándose por lo tanto un bajo porcentaje de ovocitos degenerados (1,57%), lo que sugiere que el proceso de maduración *in vitro* no induce una tasa

significativa de anomalías sobre las configuraciones cromatínicas del ovocito.

El porcentaje de ovocitos maduros fue superior en el grupo control. Esta tasa lógicamente no difirió de la alcanzada en el grupo de ovocitos vitrificados luego de la MIV, pero si se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre el grupo control y el grupo de ovocitos vitrificados en VG. La tasa de ovocitos inmaduros también fue superior en el grupo control (45,67%), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales analizados. Al comparar el porcentaje de ovocitos degenerados entre los tres grupos estudiados, se observó que este fue significativamente mayor ( $P < 0,01$ ) en el grupo de ovocitos vitrificados en estadio de VG (90,74%) que en el grupo control (Cx) y en el grupo de ovocitos vitrificados MIV.

Entre los ovocitos degenerados del grupo de VG (98 ovocitos) se encontraron características muy particulares tales como la ausencia de núcleo, presencia de huso meiótico disperso y material nuclear degenerado. La característica mayormente observada fue la ausencia de núcleo, representando un 71,29% del total de los ovocitos degenerados. Se encontró un 11,11% de ovocitos con

membrana nuclear degenerada y un 8,3% de ovocitos con huso disperso.

A pesar de que el porcentaje de supervivencia morfológica fue superior en el grupo de ovocitos vitrificados en estadio de VG, la capacidad de los mismos para alcanzar la maduración nuclear no fue tan exitosa en este grupo experimental al ser comparado con el grupo de ovocitos vitrificados MIV (2,77% vs. 39,61%, respectivamente). En general, el proceso de congelación-descongelación redujo la capacidad de maduración de los ovocitos congelados en VG, observándose esto al hacer la comparación con el grupo de ovocitos sin vitrificar.

Coincidiendo con los resultados de este estudio, Luna *et al.* (20) estudiando la influencia del estadio de maduración de ovocitos bovinos durante el proceso de vitrificación, obtuvieron una tasa de maduración inferior en el grupo de ovocitos vitrificados en estadio de VG que en MIV al compararlo con el grupo control (38,8%, 51,0% y 80,3%, respectivamente). Hurtt *et al.* (8), encontraron tasas de maduración de 60%, 70% y 77% para el grupo de ovocitos bovinos inmaduros, maduros y control, respectivamente, indicando que los ovocitos en estadio de VG fueron igualmente capaces de madurar después del proceso de vitrificación. En contraste con los resultados obtenidos en este trabajo, Aman y Parks (25), demostraron que la exposición de ovocitos bovinos en estadio de MII a temperaturas inferiores a su temperatura fisiológica compromete el desarrollo de los mismos, debido a que son sensibles a la congelación causando la despolimerización del huso meiótico e incrementando la incidencia de aneuploidías.

Agca *et al.* (22), estimaron el coeficiente de permeabilidad de los ovocitos bovinos en estadio de VG y MII utilizando etilenglicol y dimetilsulfóxido, demostrando que los ovocitos en ambos estadios tienen diferencias en cuanto a las respuestas osmóticas y al coeficiente de permeabilidad, sugiriendo que la utilización de distintos protocolos de

criopreservación en esos dos estadios deben ser optimizados para conservar su competencia de desarrollo.

La interrupción de la comunicación intercelular entre las células del cumulus y el ovocito a lo largo de la zona pelúcida durante el proceso de vitrificación, es otra razón que pudiera explicar la tasa resultante de maduración de los ovocitos criopreservados en estadio de VG del presente estudio, lo que indica que dicha comunicación intercelular es un factor necesario en el control del proceso de la maduración (26).

Otra evidencia que indica que el proceso de criopreservación, en el presente estudio, afectó la capacidad de los ovocitos vitrificados en estadio de VG para reiniciar la progresión meiótica hasta MII, es el porcentaje de ovocitos degenerados resultante (90,74%) en este grupo experimental. Tan solo un 2,77% de los ovocitos analizados presentaron un huso meiótico de morfología normal. Las anomalías incluían en su mayoría ovocitos con ausencia de núcleo, material nuclear degenerado, como también husos dispersos, cromosomas formando un apretado grupo poco definidos, observaciones que coinciden con la hecha por otros autores como Boiso (21) donde tan sólo un 5,2% de los ovocitos analizados criopreservados en VG, presentaba un huso bien estructurado en contraste con un 76,3% de ovocitos con huso ausente. La elevada incidencia de anomalías indica que la progresión meiótica en los ovocitos vitrificados en VG no ocurrió con normalidad.

En este estudio, se observa tanto en los ovocitos vitrificados en VG como en aquellos vitrificados luego de la MIV, una mayor incidencia de anomalías durante la evaluación de la progresión meiótica en comparación con el grupo control, siendo ésta superior en el grupo de ovocitos vitrificados en estadio de VG. Según Parks (27), los ovocitos bovinos son extremadamente sensibles a los agentes crioprotectores. Solo un 10% de los husos de ovocitos en estadio de MII mantu-

vieron su morfología normal después de la exposición al agente por 1 min (28). La presencia de un huso meiótico estructuralmente organizado es un requisito necesario y esencial para la formación de embriones euploides tras la fecundación (21).

En contraste con los resultados de este estudio, Gook *et al.* (29) describen mediante microscopía de fluorescencia, un 60% de husos normales en ovocitos congelados en estadio de MII con un protocolo de congelación lenta y utilizando propilenglicol como crioprotector.

En un estudio realizado por Van Blerkom y Davis (30) sobre las consecuencias citogenéticas, celulares y en el desarrollo de la criopreservación de ovocitos de ratones y humanos maduros e inmaduros, utilizando microscopía de fluorescencia, encontraron que un 18% de ovocitos en MII presentaban cromosomas dispersos y un 26% de aneuploidías. Estas observaciones sugieren que las asociaciones cromosómicas observadas en el huso de ovocitos en estadio de MI o MII es lábil y muy susceptible a roturas. Notaron exocitosis prematura de los gránulos corticales en los ovocitos vitrificados en estadio de MII en humanos y en ratones, lo que ocasiona el endurecimiento de la zona pelúcida haciéndola impenetrable al espermatozoide, originando una baja tasa de fecundación. También en el estadio de MII observaron variación significativa en la

distribución normal de los gránulos corticales, mostrando una reducción en la intensidad de fluorescencia de este grupo de ovocitos. Al igual que los ovocitos congelados en MII, los ovocitos inmaduros también presentaron profundas alteraciones citoplasmáticas, nucleares y nucleolares durante la criopreservación, sin embargo se restableció un núcleo y citoplasma aparentemente normal después del cultivo.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los ovocitos vitrificados luego de ser MIV son más aptos para continuar su desarrollo luego del proceso de criopreservación que los ovocitos vitrificados en estadio de VG, demostrando que el citoesqueleto de la primera división meiótica en los ovocitos inmaduros (VG) es particularmente susceptible al daño crioinducido. Los ovocitos en MII muestran un citoesqueleto más flexible, lo cual puede ser una razón para que ellos sean menos susceptibles al daño crioinducido (8).

#### **Efecto de la presencia de células del cumulus durante la vitrificación de ovocitos bovinos madurados *in vitro***

Se valoró la sobrevivencia de aquellos ovocitos bovinos que fueron madurados *in vitro* y posteriormente vitrificados con y sin células del cumulus. Se evaluaron un total de 311 ovocitos y sus resultados se muestran en la Tabla 3. También se estudiaron las alteraciones observadas durante la evaluación.

Tabla 3  
Sobrevivencia morfológica de ovocitos bovinos vitrificados: influencia de las células del cumulus

	n	Sobrevivientes			Degenerados			
		Óptimos	Parcial denudados	Total	Morfología alterada	Rotos-ZP vacía	Citoplasma degenerado	Total
Con células	166	119 (71,69)	23 (13,85)	142 (85,54) <sup>a</sup>	1 (0,60)	4 (2,41)	19 (11,45)	24 (14,46) <sup>a</sup>
Sin células	145	93 (64,14)	0 (0,00)	93 (64,14) <sup>b</sup>	6 (4,14)	13 (8,96)	23 (22,76)	52 (35,86) <sup>b</sup>

a,b: Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente distintos (P<0,01). ZP: zona pelúcida.

La mayor tasa de sobrevivencia morfológica (85,54%) se encontró en los ovocitos madurados *in vitro* vitrificados con células del cumulus, observándose una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre el porcentaje de sobrevivencia de los ovocitos vitrificados con y sin células del cumulus (85,54% y 61,14%, respectivamente). La anomalía observada mayormente en ambos grupos experimentales, fue la presencia de ovocitos con citoplasma contraído o degenerado. El porcentaje total de alteraciones morfológicas resultó significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) en el grupo de ovocitos vitrificados sin células (35,86%) que en el grupo cubierto con células del cumulus (14,46%).

Estos resultados parecen indicar que las células del cumulus ejercen un efecto protector importante sobre los ovocitos MIV, durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, Pellicer *et al.* (13) hacen notar que la acción mecánica como pipeteo repetido, ejercida sobre los ovocitos para la desnudación de las células del cumulus, puede alterar potencialmente al ovocito reduciendo su sobrevivencia luego del proceso de congelación-descongelación.

Johnson y Pickering (31) e Imoedemhe y Sigue (32) criopreservando ovocitos de ratón y humano respectivamente, encontraron que la tasa de sobrevivencia fue significativamente superior en ovocitos con cumulus intacto, al compararlos con aquellos sin cumulus. Esos resultados demuestran que la presencia de las células del cumulus puede ofrecer alguna protección contra cambios osmóticos y estrés inducidos por el influjo y eflujo rápido de los agentes crioprotectores en los periodos de pre-congelación y post-descongelación, así como también reducirían la toxicidad del agente crioprotector. Pellicer *et al.* (13), demuestran que la tasa de sobrevivencia de ovocitos inmaduros de rata estuvo directamente relacionada con el número de capas de células del cumulus que rodeaban al ovocito, siendo esta tasa superior en ovocitos criopreservados con 5 o más

capas de células del cumulus (64%), en comparación con aquellos criopreservados y que poseían 3 capas de células y aquellos completamente desnudos (21% y 10%, respectivamente).

Fabbri *et al.* (12), observaron que la presencia de células del cumulus o la total remoción de estas células no modificó significativamente la tasa de sobrevivencia de los ovocitos. Gook *et al.* (29), encontraron que los ovocitos rodeados por una masa de cumulus presentaron una tasa de sobrevivencia significativamente reducida (48%), comparada con aquellos ovocitos a los cuales les fueron removidas las células del cumulus previo a la congelación (69%), sugiriendo que la presencia de células del cumulus hace que el ovocito se comporte de manera distinta durante la criopreservación causando en gran medida deshidratación durante la criopreservación y a su vez diferencias en las tasas de sobrevivencia. Dhali *et al.* (4), también sugieren que la presencia de la masa de cumulus podría reducir el paso de los crioprotectores dentro del ovocito sugiriendo que el complejo cúmulo-corona puede formar una estructura más rígida impidiendo el paso de dichos agentes. Según Vajta (33), la presencia de estas capas de células del cumulus reduce la velocidad de penetración del crioprotector durante el período de equilibrio o en la dilución, afectando así la sobrevivencia del ovocito.

Los ovocitos deben sobrellevar la maduración nuclear alcanzando el estadio de MII, para ser capaces de continuar desarrollándose hasta estadios embrionarios posteriores luego de una correcta fecundación. Para evaluar el efecto de la presencia o no de las células del cumulus sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos vitrificados, estos fueron clasificados de acuerdo a sus configuraciones cromatinicas, igual que en el punto 1, en: maduros, inmaduros y degenerados.

Se evaluaron un total de 207 ovocitos luego de ser madurados *in vitro* y vitrifica-

Tabla 4  
Tasas de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos vitrificados con y sin células del cumulus

	n	Maduros			Inmaduros				Degenerados (%)	
		MII	TeloI	Total mad (%)	AnaI	MI	CCII	VG		Total inm (%)
Con células	114	48	1	49 (42,98)	3	22	7	6	38 (33,33)	27 (23,68)
Sin células	93	33	0	33 (35,48)	2	20	4	0	26 (27,96)	34 (36,56)

VG: Vesícula germinal. CCII: Condensación cromosómica II. MI: Metafase I. Ana I: anafase I. Telo I: telofase I. MII: Metafase II.

dos en presencia o ausencia de células del cumulus. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos luego de la evaluación de la progresión meiótica de los ovocitos en los distintos grupos experimentales. Al comparar los ovocitos madurados *in vitro* y vitrificados en presencia o no de células del cumulus, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de maduración ni en la tasa de ovocitos inmaduros. La tasa de degeneración tampoco difirió estadísticamente entre ambos grupos experimentales.

En este estudio, a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de maduración ni en la tasa de ovocitos inmaduros en los grupos vitrificados con células y sin ellas, los resultados obtenidos fueron superiores en los ovocitos vitrificados con células del cumulus. En relación a la tasa de ovocitos degenerados, tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, pero este porcentaje fue superior en los ovocitos vitrificados en ausencia de las células. Dicho resultado coincide con la baja sobrevivencia morfológica post-congelación observada en este grupo, caracterizándose entonces los ovocitos MIV vitrificados sin células del cumulus por presentar un mayor número de anomalías en las configuraciones cromatínicas del ovocito. Esto

demuestra que los ovocitos MIV vitrificados en presencia de las células del cumulus lograron conservar mejor la configuración del huso meiótico, siendo otro indicativo del efecto protector que presentan estas células durante el proceso de criopreservación.

### Conclusiones

El presente estudio indica que el proceso de vitrificación representa una alternativa rápida, económica y sencilla entre los distintos métodos para criopreservar ovocitos bovinos en diferentes estadios meióticos. Sin embargo, con el protocolo utilizado puede verse afectada la progresión meiótica del ovocito.

La mayor tasa de sobrevivencia morfológica se obtuvo con ovocitos vitrificados en estadio de VG. A pesar de que en este estadio la cromatina está protegida por la membrana nuclear, lo cual debería conferirle protección contra el daño crioinducido, en estos ovocitos se obtuvo el menor porcentaje de maduración y el mayor número de anomalías, lo que indica que la progresión meiótica en estos ovocitos en estadio de VG, no ocurrió con normalidad. En los ovocitos vitrificados MIV también se encontraron anomalías cromosómicas, lo cual demuestra que el huso meiótico es vulnerable al proceso de criopreservación. A pesar de esto, en el presente estudio se determinó que los ovocitos

madurados *in vitro* son los más aptos para continuar su desarrollo luego del proceso de congelación-descongelación.

En este estudio también se determinó la influencia de las células del cumulus durante el proceso de criopreservación. Aunque el papel preciso de estas células en el proceso de congelación-descongelación es incierto, se ha establecido que dichas células son importantes para el desarrollo del ovocito. Ovocitos madurados *in vitro* y vitrificados en presencia de células del cumulus sobrevivieron morfológicamente en mayor proporción, lo que indica que las células del cumulus ejercen un efecto protector contra los daños crioinducidos. Por otra parte, la tasa de maduración obtenida en los ovocitos congelados con células del cumulus permitió evidenciar que éstos lograron conservar mejor las configuraciones cromatínicas normales.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto CONDES CC-08160-01.

### Referencias Bibliográficas

- VILLAMEDIANA P. Embriones caprinos producidos *in vitro*: Estudio citogenético y ultraestructural de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* (Tesis Doctoral), Universitat Autònoma de Barcelona (España), pp. 172. 1998.
- MARTINO A., POLLARD J., LEIBO S. **Molecular Reproduction and Development** 45: 503-512, 1996.
- CHA K., CHUNG H., LIM J., KO J., HAN S., CHOID., YOON T. **Molecular and Cellular Endocrinology** 169: 43-47, 2000.
- DHALI A., MANIK R.S., DAS S.K., SINGLA S.K., PALTA P. **Animal Reproduction Science** 63: 159-165, 2000A.
- BOS-MIKICH A., WOOD M.J., CANDY C.J., WITTINGHAM D.G. **Biology of Reproduction** 53: 780-785, 1995.
- NAKAGATA N. **Journal of Reproduction and Fertility** 87: 479-483, 1989.
- FUKU E., KOJIMA T., SHIOYA Y., MARCUS G.J., DOWNEY B.R. **Cryobiology** 29: 485-492, 1992.
- HURTT A.E., LANDIM-ALVARENGA F., SEIDEL G.E., SQUIRES E.L. **Theriogenology** 54: 119-128, 2000.
- PAPIS K., SHIMIZU M., IZAIKE Y. **Theriogenology** 54: 651-658, 2000.
- DHALI A., MANIK R.S., DAS S.K., SINGLA S.K., PALTA P. **Theriogenology** 53: 1295-1303, 2000B.
- CHOI Y.H., CARNEVALE E.M., SEIDEL G.E., SQUIRES E.L. **Theriogenology** 56: 661-670, 2001.
- FABBRI R., PORCU E., MARSELLA T., ROCCHETTA G., VENTUROLI S., FLAMIGNI C. **Human Reproduction** 16: 411-416, 2001.
- PELLICER A., LIGHTMAN A., PARMER T., BEHRMAN H., CHERNEY A. **Fertility and Sterility** 50: 805-810, 1988.
- MARQUANT-LE GUIENNE B., GERARD M., SOLARI A., THIBAUT C. **Reproduction Fertility and Development** 29: 559-568, 1989.
- ASADA M., FUKUI Y. **Theriogenology** 54: 889-898, 2000.
- FUKU E., XIA L., DOWNEY B. **Cryobiology** 32: 139-156, 1995.
- HOCHI S., KIMURA K., ITO K., HIRABAYASHI M. **Theriogenology** 47: 345 Abstract, 1997.
- FUKU E., XIA L., DOWNEY B. **Cryobiology** 32: 139-156, 1995.
- MEN H., MONSON R., RUTLEDGE J. **Theriogenology** 57: 1095-1103, 2002.
- LUNA H.S., FERRARI I., RUMPF R. **Animal Reproduction Science** 68: 23-28, 2001.
- BOISO I. Efecto de la criopreservación sobre la estructura del huso meiótico de ovocitos humanos madurados *in vitro* (Te-

- sis Doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona (España), pp. 161, 2001.
22. AGCA Y., LIU J., PETER A., CRITSER E., CRITSER J. **Molecular Reproduction and Development** 49: 408-415, 1998.
  23. MARTINO A., PALOMO M.J., MOGAS T., PARAMIO M.T. **Theriogenology** 42: 859-873, 1994.
  24. IZADYAR F., HAGE W.J., COLENBRANDER B., BEVERS M. **Molecular Reproduction and Development** 49: 444-453, 1998.
  25. AMAN R., PARKS J. **Biology of Reproduction** 50: 103-110, 1994.
  26. HOCHI S., KOZAWA M., FUJIMOTO T., HONDO E., YAMADA J., OGURI N. **Cryobiology** 33: 300-310, 1996.
  27. PARKS J., RUFFING N. **Theriogenology** 37: 59-73, 1992.
  28. LIM J.M., KO J.J., HWANG W.S., CHUNG H.M., NIWA K. **Theriogenology** 51: 1303-1310, 1999.
  29. GOOK D., OSBORN S., JOHNSTON W. **Human Reproduction** 8: 1101-1109, 1993.
  30. VAN BLERKOM J., DAVIS P. **Microscopy Research and Technique** 27: 165-193, 1994.
  31. JOHNSON M.J., PICKERING S.J. **Development** 100: 313-324, 1987.
  32. IMOEDEMHE D.G., SIGUE A.B. **J Assist Reprod Genet** 9: 323-327, 1992.
  33. VAJTA G. **Embryo Transfer Newsletter** 15 (12): 12-18, 1997.