



INITRA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

VITRIFICACION DE OVOCITOS BOVINOS POR SISTEMA DE MINIMO VOLUMEN, APORTES BIOQUIMICOS

Gutnisky C., Morado S., Gadze T., Donato A., Álvarez G., Dalvit G., Cetica P.

Introducción

La actividad pecuaria bovina es la más importante de la Argentina y en este contexto es lógico pensar que cualquier biotecnología que potencie esta explotación es beneficiosa para la economía del país. Por otro lado, las biotecnologías asociadas a la reproducción permiten obtener mayor progreso genético y disminuir la incidencia de enfermedades de transmisión sexual, entre otras aplicaciones. La vitrificación es una biotecnología que permite la criopreservación de ovocitos y embriones. Como describimos en un artículo del año 2018 ⁽¹⁾, se trata de una biotecnología que permite el enfriamiento ultrarápido utilizando soluciones con alta concentración de sustancias crioprotectoras que evitan la formación de cristales de hielo. Sin embargo, estas altas concentraciones de crioprotectores producen daño celular principalmente por su toxicidad y su efecto osmótico.

Esta biotecnología ha sido aceptada en humanos y es utilizada en forma rutinaria para la preservación de la gameta femenina y embriones, sin embargo en la especie bovina su implementación está en desarrollo. Si bien la vitrificación de embriones bovinos es realizada con éxito, la eficiencia de esta técnica es reducida en ovocitos. Dentro de las principales causas de esta disminución se encuentran los daños a las fibras del citoesqueleto y la alta cantidad de lípidos presentes en el ovocito bovino que lo harían más susceptible a la criopreservación. Las bajas temperaturas producirían daños a nivel de citoesqueleto, por ejemplo, la alteración en el huso meiótico. Por otro lado, también se ha demostrado que la vitrificación induce alteraciones en el estado de oxidación-reducción, en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y en el contenido de glutatión de las células. Todas estas alteraciones inducirían daños a nivel del ADN, de las proteínas y de los lípidos de membrana que contribuirían a la disfunción mitocondrial y a la reducción en las tasas de fecundación. Algunas de estas anomalías podrían ser reversibles dependiendo del tiempo de recuperación luego del atemperado.

En el artículo anterior ⁽¹⁾, mostramos que la vitrificación en ovocitos bovinos no producía modificaciones en la morfología ni en la vitalidad de las gametas. Sin embargo, se reducía la capacidad de éstos a ser fecundados respecto a los ovocitos frescos. Recientemente hemos evaluado la vitrificación de ovocitos bovinos por el método de mínimo volumen Cryotech® analizando la fecundación *in vitro* (FIV), el desarrollo embrionario temprano y la variación de parámetros bioquímicos luego del atemperado.

Trabajo realizado

Los complejos ovocito-cumulus (COCs) bovinos se obtuvieron a partir de ovarios provenientes de vacas de faena. Se seleccionaron bajo lupa estereoscópica aquellos COCs con cumulus denso y compacto. La maduración *in vitro* se realizó en medio 199 suplementado con suero fetal bovino y gonadotropinas (FSH y LH). Para la FIV y el desarrollo embrionario los COCs madurados fueron divididos en tres grupos: a) COCs sin desnudar (control de FIV), b) ovocitos parcialmente desnudados (control) y c) ovocitos parcialmente desnudados vitrificados/atemperados (según especificaciones del kit y capacita-

ción de Cryotech® para uso humano). Los diferentes grupos fueron coincubados con semen congelado de fertilidad probada y se determinó el porcentaje de FIV a través de la división embrionaria a dos o más células a las 48 horas y el porcentaje de blastocistos obtenidos a los 8 días post-fecundación.

Para el análisis de las pruebas bioquímicas, al finalizar la maduración, los ovocitos fueron denuclados y divididos en dos grupos: a) control y b) vitrificados/atemperados. Las pruebas bioquímicas incluyeron la determinación del status oxidativo, mitocondrias activas, niveles de ROS y estado redox del ovocito. Los ovocitos vitrificados fueron evaluados luego de su atemperado al recuperar su volumen normal (0 horas), cuando se presume su recuperación metabólica (3 horas) y al tiempo que se correspondería para la formación de pronúcleo-fecundación (21 horas). Los controles fueron ovocitos que no fueron vitrificados, evaluados a los mismos tiempos.

Las determinaciones de status oxidativo, mitocondrias activas y ROS se realizaron a través de los registros de la intensidad de fluorescencia utilizando los fluorocromos específicos Redoxsensor Red, Mitotracker green y DCHFDA, respectivamente. El estado redox del ovocito se determinó a través de la intensidad de la autofluorescencia del NAD(P)H.

Resultados

Los ovocitos vitrificados-atemperados mostraron diferencias en el porcentaje de división a las 48 horas posteriores a la fecundación (31,18 %) respecto al control de la vitrificación (57,4 %) y el control de la FIV (79,6 %) ($p < 0,05$). Estas diferencias significativas entre los distintos grupos también se registraron cuando se analizó el desarrollo embrionario temprano. Se observó un porcentaje de blastocistos significativamente menor en el grupo vitrificado-atemperado (8,8 %) respecto al control de vitrificación (18,2 %) y al control de la FIV (35,5 %) ($p < 0,05$).

Debido a los resultados obtenidos y para tratar de explicar las diferencias en las tasas de división celular y desarrollo embrionario, se analizaron distintos parámetros bioquímicos que puedan en parte explicar estos efectos. En todos los parámetros bioquímicos estudiados se observaron variaciones a lo largo del tiempo (0, 3 y 21 horas post- atemperado) ($p < 0,05$). Para el status oxidativo no se observaron diferencias entre los 2 grupos (control y vitrificados) a los distintos tiempos analizados. Sin embargo, para la cuantificación de mitocondrias activas se registró un incremento a las 0 y 3 horas post-atemperado en el grupo vitrificado respecto a su control ($p < 0,05$), equiparándose con el control a las 21 horas. En cuanto a los niveles de ROS producidos, se observaron diferencias entre ambos grupos a todas las horas estudiadas ($p < 0,05$). El estado redox fue el único parámetro que no mostró diferencias por efecto de la vitrificación.

Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que el método de vitrificación de ovocitos bovinos por mínimo volumen Cryotech® y posterior atemperado, permite la criopreservación de ovocitos bovinos demostrando que los mismos pueden ser fecundados *in vitro*, aunque la tasa de fecundación es inferior a la de los ovocitos frescos. Es importante también destacar que se han obtenido blastocistos a partir de ovocitos vitrificados lo que significa un gran avance en la criopreservación de ovocitos en esta especie, aunque la tasa de blastocistos sea menor a la obtenida a partir de ovocitos frescos. Los estudios realizados mostraron cambios bioquímicos en los ovocitos que fueron vitrificados y atemperados, indicando que este proceso produciría alteraciones metabólicas que podrían modificar la capacidad del ovocito de ser fecundado y que desarrolle a blastocisto. Sobre este punto se debe trabajar para tratar de atenuar dichas alteraciones metabólicas y lograr aumentar las tasas de división celular y desarrollo embrionario y convertir a esta técnica de criopreservación en una herramienta adecuada para la especie bovina. Insistimos en que queda aún un largo camino por recorrer en la mejora del proceso de vitrificación de ovocitos bovinos pero los resultados a la fecha son alentadores.

Para consultar el trabajo completo remitirse a Gutnisky y col. 2020, *Theriogenology* 143:18-26.

(1) Gutnisky, C., Morado, S., Gadze, T., Donato, A. y Cética, P. 2018. La vitrificación de ovocitos por sistema de mínimo volumen, método potencial para la criopreservación de la gameta femenina en bovinos. Suplemento INITRA de Taurus, Año 20 N° 79:26-28.