

# ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL HUSO MEIÓTICO DE OVOCITOS BOVINOS VITRIFICADOS.

## Structural Study of Meiotic Spindle of Vitrified Bovine Oocytes.

**Francisco J. Báez Contreras, Ludwing Hernández y Patricia C. Villamediana Monreal**

Laboratorio de Citogenética. Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Apartado Galerías 15692. E-mail: [patriciavillamediana@cantv.net](mailto:patriciavillamediana@cantv.net)

### RESUMEN

La vitrificación de ovocitos bovinos se ha venido utilizando como uno de los protocolos de criopreservación más prometedores. Se ha expresado el temor por los efectos que puede causar la utilización de aditivos crioprotectores sobre la integridad estructural de los ovocitos. En este trabajo, los experimentos fueron conducidos para evaluar el efecto de la vitrificación sobre la estructura del huso meiótico y la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos. Para ello, ovocitos acabados de liberar de sus folículos y madurados *in vitro* fueron expuestos a temperatura ambiente a las soluciones vitrificadoras (etilenglicol y sacarosa), también fueron vitrificados ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*. Los ovocitos fueron teñidos *in toto*, para evaluar la maduración nuclear y a través de la tinción inmunocitoquímica fueron estudiadas las alteraciones estructurales del huso meiótico. Los ovocitos en estadio de VG, son más sensibles al efecto tóxico causado por los agentes crioprotectores a temperatura ambiente y al proceso de criopreservación, valorados mediante la progresión meiótica y el análisis inmunocitoquímico del huso meiótico. La anomalía más frecuentemente observada fue la ausencia de huso meiótico. La estructura del huso meiótico de ovocitos vitrificados MIV, es más resistentes al daño crioinducido, que los ovocitos vitrificados en estadio de VG. Se recomienda la vitrificación de ovocitos bovinos madurados *in vitro*.

**Palabras clave:** Vitrificación, ovocitos, bovinos, MIV, inmunocitoquímica.

### ABSTRACT

Bovine oocytes vitrification has been used as one of the most promising cryopreservation protocols. Fear of the effects of

cryoprotectant additives on the oocytes structural integrity have been posed. In this study, trials were conducted to evaluate the effects of vitrification over meiotic spindle structure and development capability in bovine oocytes. Based in this evidence, oocytes recently released from their follicles and *in vitro* matured were exposed at room temperature to vitrifying solutions (ethylenglicol and sucrose), also immature and *in vitro* matured oocytes were vitrified. Oocytes were stained *in toto* to assess nuclear maturation stage and meiotic spindle structural alterations were studied by immunocytochemistry. Oocytes at GV stage are more sensitive to the toxic effects caused by cryoprotectant agents at room temperature and to the cryopreservation procedure, assessed through meiotic progression and immunocytochemical analysis of meiotic spindle. The most frequently encountered anomaly was absence of meiotic spindle. Meiotic spindle structure in vitrified and IVM oocytes endure better the cryoinduced injuries compared with oocytes vitrified the GV stage. It is recommend the vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes.

**Key words:** Vitrification, oocytes, bovine, MIV, immunocytochemical.

### INTRODUCCIÓN

En la década de los '80, a medida que se iban desarrollando las tecnologías de manipulación *in vitro* de la reproducción, tomaba importancia el significado de las técnicas de criopreservación de ovocitos, haciendo posible preservar las fuentes de alto valor genético por largos periodos de tiempo [22]. El uso del frío asociado a los conocimientos de los fenómenos físico-químicos involucrados en el congelamiento de la materia viva, ha hecho posible el desarrollo de técnicas de criopreservación [25]. La vitrificación es uno de los protocolos de criopreservación más prometedores. Este se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizadas a muy altas

concentraciones, que a bajas temperaturas aumenta su viscosidad formando vidrio, sin formación de hielo [5].

Se sabe que los ovocitos son particularmente difíciles de criopreservar debido a su sensibilidad frente a los cambios de temperatura y presión osmótica extracelular durante la congelación y descongelación, lo que ocasiona desorganización del citoesqueleto, anomalías cromosómicas, desorganización del huso entre otras [10, 12]. La utilización de aditivos crioprotectores en los medios de congelación mejora notablemente la integridad estructural de las células, a pesar de la ligera toxicidad de alguno de ellos [14, 26].

Estudios previos realizado por el grupo de autores, con ovocitos bovinos inmaduros y madurados *in vitro* vitrificados en presencia o no de células de cumulus [23], recomiendan la criopreservación de ovocitos madurados *in vitro* en presencia de células, proponiéndose un estudio inmunocitoquímico, para una mejor evaluación de los efectos de vitrificación y los agentes crioprotectores sobre la estructura del huso meiótico y los cromosomas en ovocitos bovinos frescos y criopreservados inmaduros y madurados *in vitro*. El objetivo general de este trabajo fue analizar el efecto de la vitrificación sobre la estructura del huso meiótico y la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención y selección de los ovocitos:** Se recogieron los ovarios de vacas sacrificadas en un matadero comercial siendo transportados al laboratorio en buffer fosfato salino (PBS) + gentamicina (50 mg/L) a 37°C en recipientes isotérmicos. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces con PBS + gentamicina (50 mg/L) a 37°C. Los complejos cumulus-ovocito fueron recuperados mediante la técnica de recogida en masa (*slicing*) [28], que consiste en cortar sucesivamente la superficie del ovario con una hoja de bisturí en una placa de petri conteniendo medio TCM-199 (AT094, HiMedia) suplementado con 2,2 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>, 50mg/L gentamicina y 11,1 mg/L de heparina (H-9399, Sigma), liberándose así, ovocitos provenientes de folículos de cualquier tamaño. Fueron seleccionados bajo un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZX12, EUA) aquellos ovocitos con mayor tamaño, al menos una capa de células del cumulus compacto y citoplasma homogéneo.

**Maduración *in vitro* de ovocitos:** El medio de maduración fue el 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), 10µg/mL de Follitropin-V® y 10% de suero fetal bovino (FBS). Los complejos cumulus-ovocito fueron cultivados en grupos de 15, en microgotas de 50 µl de medio cubiertas con aceite mineral (69794, Fluka) durante 27 horas a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad [17].

**Criopreservación de los ovocitos:** Los ovocitos con cúmulos compacto y citoplasma homogéneo fueron vitrificados siguiendo un protocolo sencillo, propuesto por Asada y Fukui [3] con ciertas modificaciones. Los ovocitos fueron lavados tres veces en PBS con 10% de FBS, siendo luego transferidos y equilibrados por 10 minutos en una solución vitrificadora, la cual consistió en 1,8M de etilenglicol (EG), 0,1M de sacarosa, 10% de FBS en PBS. Posteriormente fueron cargados en tubos criogénicos, colocándose de 10 a 15 ovocitos por tubo en 100µL de solución vitrificadora, sumergiéndolos directamente en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L) por 1 minuto. Después de un periodo de al menos siete días en N<sub>2</sub>L, la descongelación se realizó, exponiendo los ovocitos durante 10 segundos al aire y luego en agua a 37°C por 20 segundos, colocándolos en la solución desvitrificadora (0,5M de sacarosa en PBS y 10% de FBS) por 10 minutos, antes de ser transferidos al medio de maduración.

**Evaluación de la progresión meiótica:** Para evaluar la progresión meiótica, los ovocitos fueron desnudados de sus células del cumulus mediante agitación mecánica y fijados en una mezcla de metanol ácido-acético en proporción 3:1 durante al menos 24 horas a 4°C. Luego se procedió a teñirlos con aceto-orceína al 1,1% evaluando bajo microscopio óptico (OLYMPUS CX31, EUA) (400X) la maduración nuclear, clasificándolos, según el estadio meiótico alcanzado en: maduros (MII+Telol) 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.

**Tinción inmunocitoquímica del huso meiótico:** La técnica utilizada para la tinción inmunocitoquímica fue la propuesta por Pickering y col. [21] con ciertas modificaciones. Los ovocitos fueron desnudados de las células del cumulus con PBS y fijados en una solución de paraformaldehído al 3% en PBS y mantenidos a 4°C durante al menos 24 horas. Los siguientes pasos fueron realizados a temperatura ambiente y en cámara húmeda: los ovocitos fueron mantenidos en PBS-albúmina sérica bovina (BSA) al 1% durante 30 minutos y permeabilizados con Tritón X-100 (H 5142, Promega) al 0,02% PBS por 15 minutos, antes de incubarlos con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (1:100) (T-9026, Sigma) por 1 hora. Luego fueron lavados en PBS-BSA 1% seguido de la incubación en anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a FITC 1:30 (F-4018, Sigma). La contratinción de los cromosomas se realizó incubando los ovocitos en yoduro de propidio (P-4170, Sigma) a 20µg/mL, seguido de tres lavados en PBS-BSA 1%. Los ovocitos fueron montados sobre portaobjetos con 25 µL de medio de montaje (glicerol, n-propil-galato) a los que se le adhirió una arandela de papel autoadhesiva, con un grosor aproximado de 1mm, formando así una cámara. Las muestras se cubrieron finalmente con un cubreobjetos sellando la preparación con laca de uñas. La observación de las muestras se realizó bajo un microscopio de fluorescencia (Zeiss FT 510LP 520, Germany), captando la emisión de fluorescencia

de la tubulina (FITC: 490-520 nm; color verde) y la emisión del ioduro de propidio (617 nm; color rojo) (400-1000X). Los ovocitos correspondientes al control negativo fueron teñidos solo con el anticuerpo secundario (IgG conjugado a FITC).

**Diseño experimental:** Los ovocitos fueron clasificados en cinco grupos experimentales:

- Primer Grupo (control): ovocitos obtenidos a partir de ovarios recogidos en matadero madurados *in vitro*. Estos ovocitos fueron analizados mediante tinción con acetoorceína e inmunocitoquímica del huso meiótico, para establecer patrones de normalidad de esta estructura.
- Segundo Grupo (VG<sub>o</sub>): ovocitos inmaduros fueron expuestos a los crioprotectores (solución vitrificadora por 10 minutos y solución desvitrificadora por 10 minutos) a temperatura ambiente, posteriormente fueron estudiados citogenéticamente y fijados para la tinción inmunocitoquímica para evaluar las posibles alteraciones causadas por los crioprotectores.
- Tercer Grupo (MIV<sub>o</sub>): Ovocitos recién liberados de los folículos y madurados *in vitro*, fueron sometidos igualmente a las soluciones vitrificadoras y fijados para el análisis citogenético e inmunocitoquímico.
- Cuarto Grupo (VG<sub>c</sub>): los ovocitos recién liberados de los folículos se sometieron directamente a vitrificación. Luego de al menos una semana de almacenamiento en N<sub>2</sub>L, fueron madurados *in vitro*. Posteriormente se le realizó tinción con acetoorceína e inmunocitoquímica del huso meiótico.
- Quinto Grupo (MIV<sub>c</sub>): los ovocitos obtenidos a partir de ovarios recogidos en matadero y madurados *in vitro*, fueron sometidos a vitrificación; igualmente fueron almacenados por una semana en nitrógeno líquido.

**Análisis Estadístico:** Los tratamientos fueron comparados mediante la prueba de Ji-cuadrado, bajo la aplicación del procedimiento logístico (Proc Logistic) del paquete estadístico SAS® [27].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 1128 ovocitos fueron incluidos en este estudio. En la TABLA I se muestran en resumen, la progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados correspondientes al estudio citogenético.

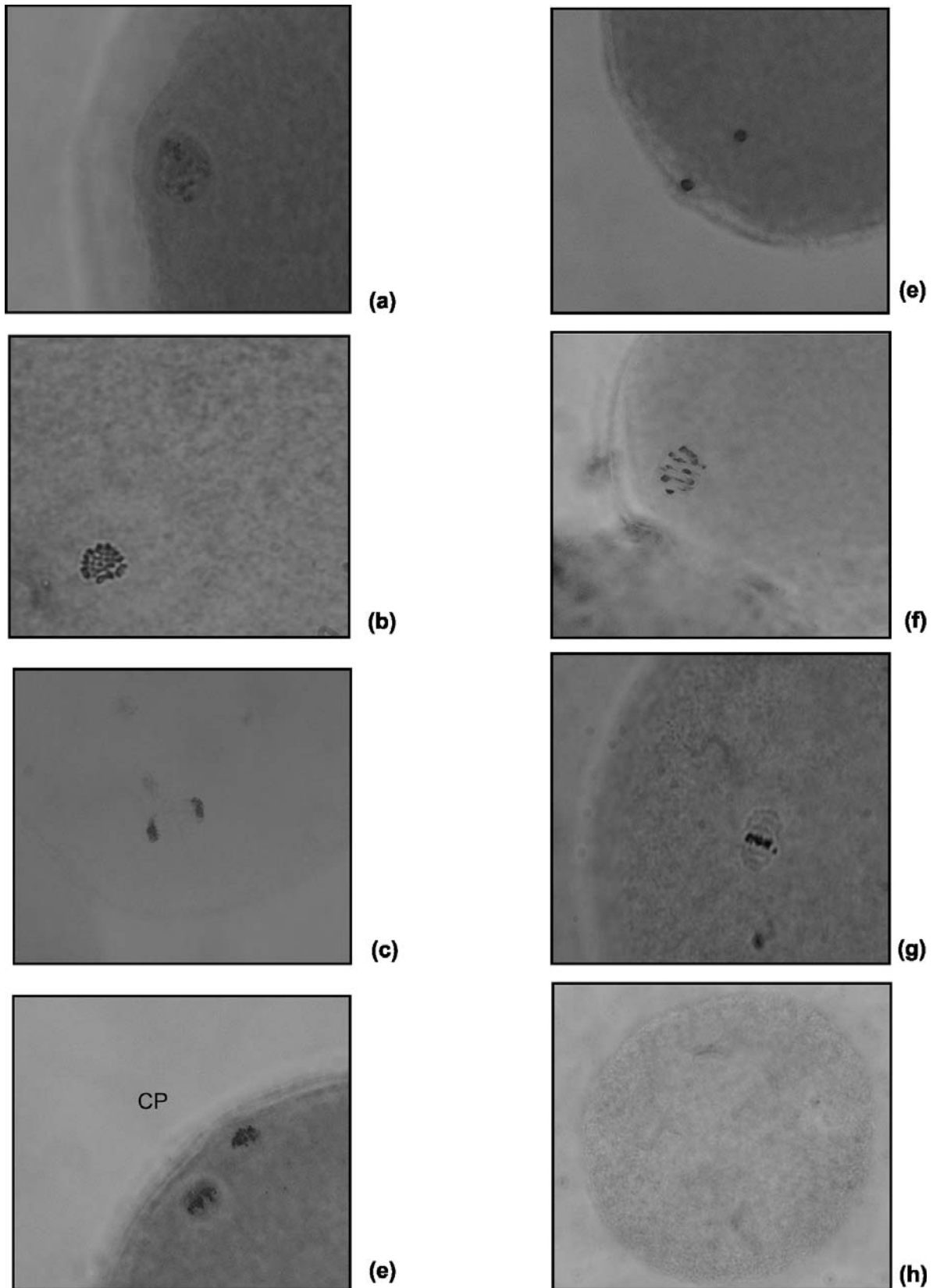
La tasa de maduración *in vitro* en el grupo control fue de 61,36%. Esta tasa no difirió de la alcanzada en el grupo de ovocitos MIV<sup>o</sup> (44,11%) y MIV<sub>c</sub> (52,85%). Se observan diferencias estadísticamente significativas (P<0,01) entre los porcentajes de los grupos de ovocitos VG<sup>o</sup> (36,36%) y VG<sub>c</sub> (8,19%) y al comparar estos últimos respecto al grupo control (61,36%).

Los porcentajes de maduración en los grupos de los ovocitos expuestos a los crioprotectores, VG<sup>o</sup> y MIV<sup>o</sup> (36,36%; 44,11%, respectivamente) resultaron estadísticamente diferentes (P<0,01) y en los ovocitos vitrificados, los grupos VG<sub>c</sub> y MIV<sub>c</sub> (8,19%; 52,85%, respectivamente) también fueron diferentes. El menor porcentaje de degeneración fue observado en el grupo control (13,63%). La tasa de ovocitos degenerados no difirió entre los grupos de ovocitos MIV<sup>o</sup> (44,11) y MIV<sub>c</sub> (28,57%); pero si fueron diferentes al compararlas con el grupo control. Mientras que los porcentajes en los grupos VG<sup>o</sup> y VG<sub>c</sub> resultaron ser diferentes (P<0,05) entre sí y respecto al grupo control. En los porcentajes de ovocitos degenerados de los grupos expuestos a las soluciones vitrificadoras VG<sup>o</sup> (40,25%) y MIV<sup>o</sup> (44,11%), no se observaron diferencias estadísticamente significativas (P<0,05). La tasa de degeneración resultó mayor en el grupo VG<sub>c</sub> (80,32%) observándose dife-

TABLA I  
PROGRESIÓN MEIÓTICA DE OVOCITOS BOVINOS VITRIFICADOS/ MEIOTIC PROGRESSION OF VITRIFIED BOVINE OOCYTES.

Tratamiento	Nº Total de Ovocitos	Nº Ovocitos Madurados			Nº Ovocitos Inmaduros				Nº Ovocitos Degenerados (%)**	
		MII + CP	Telo I	Total Ovoc. Mad. (%)*	Ana I	MI	CCII	VG		Total Ovoc. Inmd. (%)**
C <sub>x</sub>	88	47	7	54 (61,36) <sup>a</sup>	4	10	4	4	22 (25) <sup>a</sup>	12 (13,63) <sup>c</sup>
VG <sub>o</sub>	77	27	1	28 (36,36) <sup>b</sup>	1	11	4	2	18 (23,37) <sup>a</sup>	31 (40,25) <sup>b</sup>
MIV <sub>o</sub>	68	28	2	30 (44,11) <sup>a</sup>	0	6	0	2	8 (11,76) <sup>b</sup>	30 (44,11) <sup>b</sup>
VG <sub>c</sub>	61	1	4	5 (8,19) <sup>c</sup>	0	4	2	1	7 (11,47) <sup>b</sup>	49 (80,32) <sup>a</sup>
MIV <sub>c</sub>	70	33	4	37 (52,85) <sup>a</sup>	4	8	0	1	13 (18,57) <sup>a,b</sup>	20 (28,57) <sup>b</sup>

(%)\*<sup>a,b,c</sup>.valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,01). (%)\*\*<sup>a,b,c</sup>.valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05). MII+CP: metafase II + corpúsculo polar; TeloI: telofase I; Total Ovoc. mad.: total ovocitos madurados; Anal: anafase I; MI: metafase I; CCII: condensación cromosómica II; VG: vesícula germinal; Ovoc. inmd.: ovocitos inmaduros.



**FIGURA 1. PROGRESIÓN MEIÓTICA DE OVOCITOS BOVINOS. (A) VG (400X), (B) MI (400X), (C) ANA-TELOI (400X), (D) MII+CP (400X). OVOCITOS BOVINOS DEGENERADOS: (E) TELOFASE I (400X), (F-G) MI (400X), (H) AUSENCIA DE MATERIAL NUCLEAR (200X)/ MEIOTIC PROGRESSION OF BOVINE OOCYTES. (A) GV (400X), (B) MI (400X), (C) ANA-TELOI (400X), (D) MII+CP (400X). BOVINE OOCYTES DEGENERATED: (E) TELOFASE I (400X), (F-G) MI (400X), (H) ABSENCE OF NUCLEAR MATERIAL (200X).**

**TABLA II**  
**ORGANIZACIÓN MICROTUBULAR Y CROMOSOMAL DE OVOCITOS BOVINOS VITRIFICADOS/**  
**MICROTUBULAR ORGANIZATION AND CHROMOSOMAL OF VITRIFIED BOVINE OOCYTES.**

Tx	Total	Morfología del Huso				Cromosomas Dispersos (%)**
		Normal (%) <sup>a</sup>	Anormal (%)	Ausente (%)	Telofásico (%)	
C <sub>x</sub>	70	49 (70) <sup>a</sup>	6 (8,57)	6 (8,57)	9 (12,85)	7 (11,47) <sup>c</sup>
VG <sub>o</sub>	38	18 (47,36) <sup>b</sup>	7 (18,42)	11 (28,94)	2 (5,26)	18 (50) <sup>b</sup>
MIV <sub>o</sub>	42	24 (57,14) <sup>a,b</sup>	4 (9,52)	10 (23,8)	4 (9,52)	8 (21,05) <sup>c</sup>
VG <sub>c</sub>	41	2 (4,87) <sup>c</sup>	11 (26,82)	27 (65,85)	1 (2,43)	38 (95) <sup>a</sup>
MIV <sub>c</sub>	39	14 (35,89) <sup>b</sup>	7 (17,94)	15 (38,46)	3 (7,69)	15 (41,66) <sup>b</sup>

(%)<sup>a,b,c</sup>: valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05). (%)<sup>\*\* a,b,c</sup>: valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,01).

rencias estadísticamente significativa (P<0,05) con el grupo MIVc (28,57%) y el control (13,63%).

En el presente trabajo, el proceso de vitrificación redujo notablemente la capacidad de maduración de los ovocitos inmaduros vitrificados, al ser comparado con el grupo de ovocitos vitrificados, luego de ser MIV y con el control. Coincidiendo con los resultados previos del laboratorio, Rodríguez y col. [23], estudiando el efecto de la vitrificación sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos, encontraron una reducida tasa de maduración en ovocitos vitrificados en VG (2,77%), mientras que para los ovocitos tratados luego de MIV y el grupo control fue de 36,91% y 52,75%, respectivamente. Luna y col. [16] obtuvieron una tasa de maduración del 38,8% en el grupo de ovocitos bovinos vitrificados en estadio de VG, significativamente menor a la observada en el grupo MIV (51%) y el control (80,3%). Uno de los principales problemas relacionados con la congelación de ovocitos MIV es la sensibilidad del sistema microtubular a las bajas temperaturas y a los agentes crioprotectores [21]. El uso de ovocitos inmaduros evitaría ese problema, puesto que sus cromosomas se encuentran protegidos por una membrana nuclear y no existen estructuras microtubulares organizadas en forma de huso [29].

Sin embargo, Lim y col. [15] afirman que los ovocitos en estadio de VG son más sensibles a la criopreservación, debido al alto contenido en lípidos. Otoi y col. [20] sugieren que una alta concentración y variable distribución de lípidos intracelulares pueden inducir a la formación de hielo intracelular y a su vez estar asociada a la alta sensibilidad de los ovocitos frente a la criopreservación. Teniendo en cuenta que hoy día, existe un gran interés, en la posibilidad de obtener blastocistos a partir de ovocitos criopreservados que a su vez hace posible la evaluación y diseño de protocolos de criopreservación cada vez más eficientes [1, 18], Wani y col. [30] propone un protocolo de congelación lenta para ovocitos en estadio de VG, en es-

pecies particularmente sensibles a la congelación (cerda, cabra, búfalo, bovinos).

La capacidad de desarrollo de los ovocitos que han sido congelados, medida como el número de embriones viables en relación con el número de ovocitos congelados, se mantiene baja comparada con la obtenida a partir de ovocitos frescos [2]. Estos resultados no se limitan a la técnica de criopreservación *per se*, sino también, a las condiciones o pasos previos a ésta, como lo son el origen, estadio de desarrollo y MIV de los ovocitos los cuales pueden afectar su desempeño. Men y col. [19] confirman que los protocolos de maduración pueden afectar el comportamiento de los ovocitos frente a la criopreservación.

Aunque se sabe que los crioprotectores inducen alteraciones sobre las células, el mecanismo de toxicidad de éstos aún es desconocido. En general, el mecanismo de toxicidad química se refleja en la destrucción de la estructura celular, destrucción de la membrana, desnaturalización de proteínas específicas. Lo que si es seguro es, que la intensidad de la toxicidad química está directamente relacionada con la concentración de las soluciones vitrificadoras, el tiempo y temperatura de exposición [23]. Fahy y col. [11] proponen que los efectos deletéreos causados por los crioprotectores no se limita al estrés osmótico, sino que además existe un daño bioquímico, como lo es la inactivación y desnaturalización de enzimas específicas, disrupción de bombas iónicas transmembrana y otras perturbaciones relacionadas con la estructura y las funciones celulares, que implícitamente, son producto muy probablemente, a la interacción directa de los crioprotectores con las proteínas y la membrana plasmática.

Los protocolos de vitrificación propuestos por De la Peña y col. [8], Chen y col. [7], Diez y col. [9] y Albarracín [2] para ovocitos bovinos, no resultaron perjudiciales para aquellos ovocitos en estadio de VG, donde se incluye el preequilibrio a bajas concentraciones del crioprotector (EG y Dimetilsulfóxido

-DMSO-, al 10%) a temperatura ambiente, por varios segundos y luego la exposición por 2 ó 3 minutos en las soluciones vitrificadoras (EG + DMSO, al 20%) a temperatura ambiente. Coincidiendo con Cha y col. [6], quienes afirman que el corto período de exposición frente a los crioprotectores puede aliviar los severos daños en respuesta a las altas concentraciones de las soluciones vitrificadoras. Los resultados del presente trabajo muestran que los ovocitos madurados *in vitro*, resisten mejor al contacto con las soluciones vitrificadoras, EG y sacarosa a temperatura ambiente, que los ovocitos inmaduros tratados con las mismas soluciones afectando su capacidad de reiniciar la progresión meiótica hasta metafase II.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los crioprotectores sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos. En el grupo de ovocitos MIV se obtuvo una mayor tasa de maduración, que en los ovocitos tratados en estadio de VG, lo que indica que para el protocolo de vitrificación utilizado en este trabajo, el grupo de ovocitos MIV es más resistente al posible daño causado por los crioprotectores y al proceso de criopreservación.

Cuatrocientos veintisiete ovocitos fueron fijados para el análisis inmunocitoquímico, siendo analizables 230. En la TABLA II se muestran los resultados del análisis de la estructura del huso meiótico y la organización de los cromosomas de los ovocitos expuestos al proceso de vitrificación. Al evaluar los ovocitos del grupo control se pudieron describir husos normales formados por estructuras microtubulares dispuestas en forma de barril, con los polos ligeramente aguzados y orientados a la membrana plasmática con los cromosomas formando una placa compacta, ordenada y alineada en el ecuador del huso (FIG. 2a). También fueron considerados como normales, las estructuras microtubulares, que se caracterizaron por mostrar una morfología de huso telofásico con un set de cromosomas en cada polo, sin mostrar cromosomas dispersos (FIG. 2b).

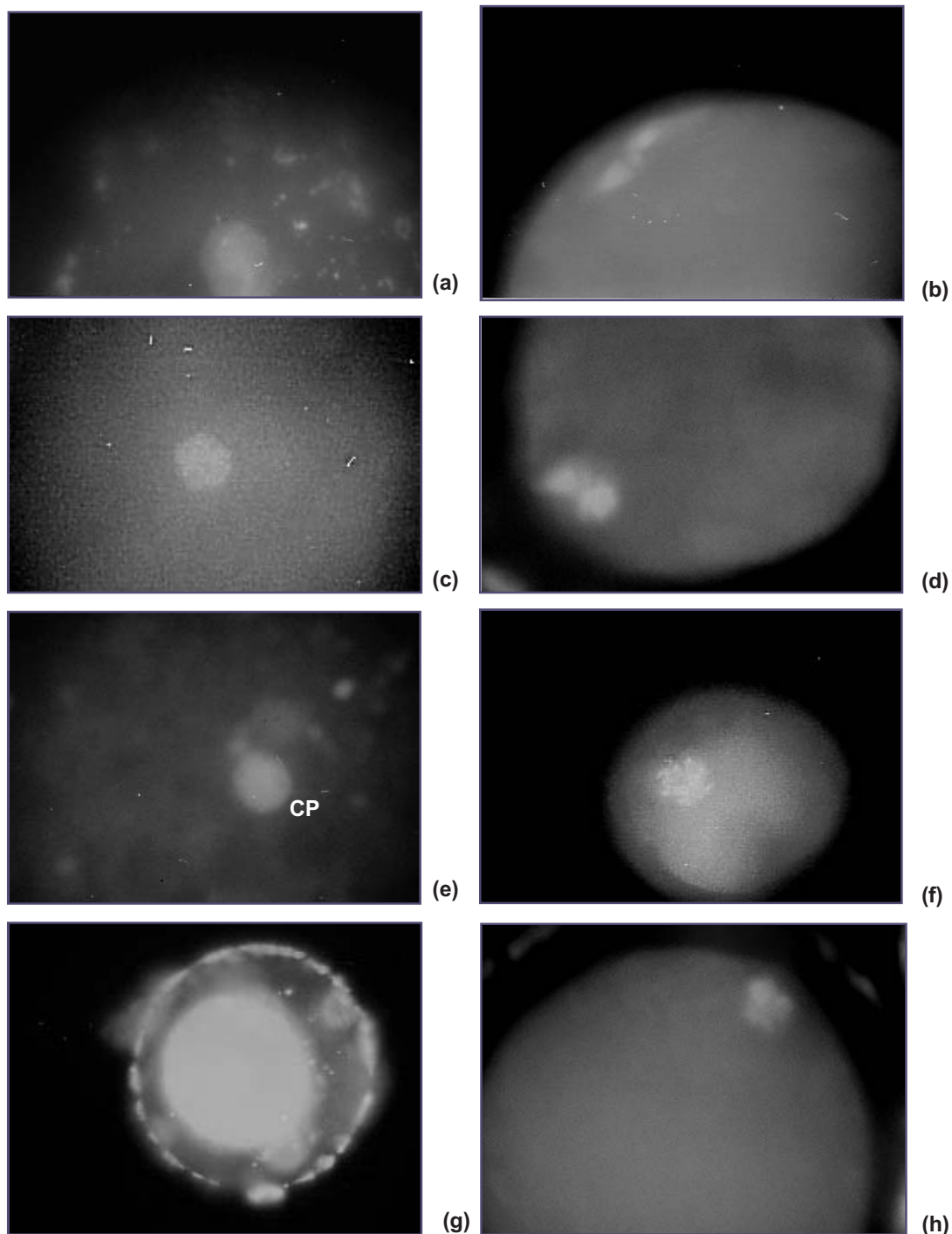
Los ovocitos restantes del grupo control, que no correspondieron con la descripción anterior, incluían: ovocitos con huso normal y cromosomas dispersos (FIG. 2c), ovocitos con estructuras microtubulares anormales y cromosomas desplazados del plano ecuatorial (FIG. 2d) y huso ausente y cromosomas compactos (FIG. 2e). En los ovocitos que para el momento de la fijación se encontraban en estadio de Profase, obviamente no se observó huso meiótico (FIG. 2f). Se clasificaron como degenerados los ovocitos que presentaron citoplasma contraído, ausencia de material nuclear y de estructura microtubular (FIG. 2g).

El porcentaje de ovocitos con husos normales en el grupo control (70%) no difirió del alcanzado por el grupo MIV<sup>t</sup> (57,14%), pero si al comparar con el grupo MIV<sup>c</sup> (35,89%). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de husos normales en el grupo de ovocitos expuestos a las soluciones vitrificadoras VG<sup>t</sup> (47,37%) y los vitrificados VG<sup>c</sup> (4,87%). Asimismo se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), al comparar la incidencia de husos normales en los grupos vitrifi-

cados en estadio de VG (4,87%) y madurados *in vitro* (35,89%) respecto al grupo control (70%). El porcentaje de cromosomas dispersos obtenido en el grupo control (11,47%), no difirió con el grupo de ovocitos MIV<sup>t</sup> (21,05%), pero si se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ) al compararlo con el grupo de ovocitos vitrificado luego de ser madurados *in vitro* (41,66%). Mientras que los porcentajes de cromosomas dispersos entre los grupos de ovocitos VG<sup>t</sup> (50%) y VG<sup>c</sup> (95%) resultaron estadísticamente diferentes ( $P < 0,01$ ) y al compararlos con el grupo control (11,47%). El mayor porcentaje de cromosomas dispersos lo presentaron ovocitos tratados con los crioprotectores, el grupo VG<sup>t</sup> (50%) difiriendo del grupo MIV<sup>t</sup> (21,05% y el control (11,47%). También se observaron diferencias ( $P < 0,01$ ) al comparar el porcentaje de cromosomas dispersos en el grupo de ovocitos vitrificados luego de ser madurados *in vitro* (41,66%) y el grupo de ovocitos vitrificados en estadio de VG (95%).

Diversos autores han demostrado que la aplicación de las distintas técnicas de criopreservación, entre las que se incluye la vitrificación, causan una severa desorganización de las placas metafásicas después de la congelación [2, 5, 7, 10, 18, 23]. Luego de la congelación lenta de ovocitos bovinos en estadio de MII, Saunders y Parks [24] observaron que ésta causa la desorganización parcial o total de los cromosomas y microtúbulos, la despolimerización de los microtúbulos y la descondensación de los cromosomas. Zenzes y col. [31] aseguran que el ensamblaje del huso no induce la dispersión de los cromosomas en el citoplasma. Los cromosomas, en ovocitos humanos siguen anclados sin dispersarse, incluso cuando los husos están dañados o ausentes, cuando se someten a temperatura ambiente, son enfriados a 0°C, o criopreservados utilizando un método lento o ultrarrápido [31]. Boiso y col. [5] describieron que la congelación lenta puede llegar a producir la desorganización o total desaparición de los microtúbulos, la aparición de cromosomas aberrantes y la descondensación parcial de los mismos en ovocitos humanos MIV.

Los cambios observados en la placa metafásica debido al proceso de vitrificación son observados en la funcionalidad del ovocito durante la fecundación y posterior desarrollo embrionario [7]. Son evidencias que involucran directamente al proceso de vitrificación con las alteraciones encontradas en los elementos del citoesqueleto. Isachenko y col. [13] sugieren que este proceso puede alterar las propiedades físico-químicas de los lípidos intracelulares. La interacción entre la fase lipídica y los elementos del citoesqueleto es compleja y el endurecimiento de estos lípidos puede causar la deformación y destrucción del citoesqueleto. Aunque el papel de los lípidos es vital, son considerados como un obstáculo para los procesos de criopreservación. Los ovocitos bovinos no escapan de esta situación, su sensibilidad a bajas temperaturas parece estar asociado a los daños causado por las numerosas gotas lipídicas sobre la estructura del huso meiótico, reportándose en éstos un incremento de las poliploidías después de la fecundación [16, 18].



**FIGURA 2. TINCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE OVOCITOS CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI- $\alpha$ -TUBULINA Y IgG CONJUGADO A FITC, PARA VISUALIZAR EL HUSO MEIÓTICO (VERDE) Y CONTRATEÑIDO CON IODURO DE PROPIDIO PARA VISUALIZAR LOS CROMOSOMAS (ROJO) (1000X). (A) HUSO NORMAL Y CROMOSOMAS COMPACTOS. (B) HUSO TELOFÁSICO. (C) HUSO NORMAL Y CROMOSOMAS DISPERSOS. (D) HUSO ANORMALES Y CROMOSOMAS DESPLAZADOS DEL PLANO ECUATORIAL. (E) HUSO AUSENTE Y CROMOSOMAS COMPACTOS. (F) OVOCITO EN ESTADIO DE VG (400X). (G) OVOCITO DEGENERADO (400X). (H) HUSO AUSENTE Y CROMOSOMAS DISPERSOS (1000X)/**  
**IMMUNOCITO-CHEMICAL STAIN OF OOCYTES WITH ANTI- $\alpha$ -TUBULIN MONOCLONAL ANTIBODY AND ANTI- MOUSE IgG FITC CONJUGATE, TO VISUALIZE MEIÓTIC SPINDLE (GREEN) AND COUNTERSTAINED WITH PROPIDIUM IODIDE TO VISUALIZE CHROMOSOMES (RED) (1000X). (A) NORMAL SPINDLE AND COMPACT CHROMOSOMES. (B) TELOFÁSIC SPINDLE. (C) NORMAL SPINDLE AND DISPERSED CHROMOSOMES. (D) ABNORMALS SPINDLE AND DISORGANIZED CHROMOSOMES FROM ECUATOR. (E) ABSENCE SPINDLE AND COMPACT CHROMOSOMES. (F) OOCYTE GV STATE (400X). (G) DEGENERATED OOCYTE (400X). (H) ABSENCE SPINDLE AND DISPERSED CHROMOSOMES (1000X).**

Varios autores han sugerido el uso de la vitrificación de ovocitos en GVBD (ruptura de la vesícula germinal) como una solución a las limitaciones evidenciadas en VG [12,15] y en MII [18]. Barnes y col. [4] observaron que los ovocitos bovinos en GVBD eran más resistentes al enfriamiento que los ovocitos en estadio de VG o MII. El estudio realizado por Albarracín y col. [2], sugiere que ovocitos en GVBD son menos sensibles a la vitrificación, debido a que no presentan una organización estricta de los cromosomas ni de los microtúbulos.

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

## CONCLUSIONES

El proceso de vitrificación afecta la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos. Se corrobora que el estadio meiótico en que se encuentran los ovocitos al momento de la vitrificación, influye sobre la capacidad de éstos de resistir el proceso de criopreservación, siendo el estadio de VG más sensible al efecto tóxico de los crioprotectores a temperatura ambiente y al proceso de criopreservación como tal. El protocolo de vitrificación utilizado en este estudio resultó ser menos perjudicial para los ovocitos bovinos madurados *in vitro*.

La vitrificación tiene efecto deletéreo sobre la estructura del huso meiótico de ovocitos bovinos congelados tanto en vesícula germinal como en la de aquellos madurados *in vitro*. La anomalía mayormente observada fue la ausencia de huso meiótico. La estructura del huso meiótico de ovocitos bovinos madurados *in vitro* resultó ser más resistente al daño crioinducido.

## AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGCA, Y. Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue. *Ilar J.* 41: 207-220. 2000.
- [2] ALBARRACÍN, J.; MORATÓ, R.; ROJAS, C.; MOGAS, T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenol.* 63: 890-901. 2005.
- [3] ASADA, M.; FUKUI, Y. Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenol.* 54: 889-898. 2000.
- [4] BARNES, F.; DAMIANI, P.; LOONEY, C.; DUBY, T. The meiotic stage affects subsequent development of cooled bovine oocytes. *Theriogenol.* 47: 183 [Abstract]. 1997.
- [5] BOISO, I.; MARTÍ, M.; SANTALÓ, J.; PONSÁ, M.; BARRI, P.; VEIGA, A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase stage. *Hum. Reprod.* 7: 1885-1891. 2002.
- [6] CHA, K.; CHUNG, H.; LIM, J.; KO, J.; HAN, S.; CHOI, D.; YOON, T. Freezing immature oocytes. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 169: 43-47. 2000.
- [7] CHEN, C.; WANG, C.; TSAI, W.; HSIEH, L.; WANG, H.; SOONG, Y. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy. *Fert. and Steril.* 82 (3): 666-672. 2004.
- [8] DE LA PEÑA, E.; TAKAHASHI, Y.; ATABAY, E.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. Vitrification of Mouse Oocytes in Ethylene Glycol-Raffinose Solution: Effects of Preexposure to Ethylene Glycol or Raffinose on Oocyte Viability. *Cryobiol.* 42: 103-111. 2001.
- [9] DIEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.; TAMARGO, C.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, L.; DE LA VEGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenol.* 64: 317-333. 2005.
- [10] FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T.; PRIMAVERA, M.; ROCCHETTA, G.; CIOTTI, P.; MAGRINI, O.; SERACCHIOLI, R.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI, C. The technical aspects of Oocyte Cryopreservation. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 169: 39- 42. 2000.
- [11] FAHY, G. The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. *Cryobiol.* 23: 1-13. 1986.
- [12] FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiol.* 32: 139- 156. 1995.
- [13] ISACHENKO, V.; SOLER, C.; ISACHENKO, E.; SANCHEZ, F.; GRISHCHENKO, V. Vitrification of Immature porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant. *Cryobiol.* 36: 250-253. 1998.
- [14] LIEBERMANN, J.; TUCKER, M. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reprod.* 124 (4): 483-489. 2002.
- [15] LIM, J.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages



- followed by in vitro maturation and fertilization. **Theriogenol.** 37:351-361. 1992.
- [16] LUNA, H.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Anim. Reprod. Sci.** 68: 23-28. 2001.
- [17] MARQUANT, B.; GERARD, M.; SOLARI, A.; THIBAUT, C. In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro. **Reprod Fert Develop.** 29: 559-568. 1989.
- [18] MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. **Reprod. Nutr. Dev.** 43: 325-330. 2003.
- [19] MEN, H.; MONSON, R.; RUTLEDGE, J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance. **Theriogenol.** 57: 1095-1103. 2002.
- [20] OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; SUZUKI, T. *In vitro* fertilization and developmental of immature and mature bovine oocyte cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiol.** 34: 36-41. 1997.
- [21] PICKERING, S.; BRAUDE, P.; JOHNSON, M.; CANT, A.; CURIE, J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in human oocyte. **Fert. and Steril.** 54: 102- 108. 1990.
- [22] RALL, W. Factors Affecting the Survival of Mouse Embryos Cryopreserved by Vitrification. **Cryobiol.** 24: 387-402. 1987.
- [23] RODRÍGUEZ, B.; MOLINA, J.; VILLAMEDIANA, P. Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. **Cien.** 12 (2): 125-136. 2004.
- [24] SAUNDERS, K; PARK , J. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro matured bovine oocytes. **Biol. of Reprod.** 61:178-187. 1999.
- [25] SEGURA, J.; MONTES, R. Razones y estrategias para la conservación recursos genéticos animales. **Rev. Bio-med.** 12: 196-206. 2001.
- [26] SHAW, J.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenol.** 53: 59-72. 2000.
- [27] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide, 8.2 Edition. Cary, NC; 2001.
- [28] SUSS, U.; MADISON, V. Morphology and meiotic development of bovine oocytes culture *in vitro*. **Arch Androl.** 11:217-218. 1983.
- [29] VIEIRA, A.; MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.; LEHMKUHL, R.; RUBIN, M.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiol.** 45: 91-94. 2002.
- [30] WANI, N.; MISRA, A.; MAURYA, S. Maturation rates of vitrified-thawed immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of different types of cryoprotectants. **Anim Reprod. Sci.** 84: 327-335. 2004.
- [31] ZENZES, M.; BIELECK, R.; CASPER, R.; LEIBO, S. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. **Fert. and Steril.** 75:769-777. 2001.