

## **EFFECTO DE UN TRATAMIENTO DE PREMADURACIÓN CON ROSCOVITINA PREVIO A LA VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS DE TERNERA EN ESTADIO DE VESÍCULA GERMINAL ROTA SOBRE EL POSTERIOR DESARROLLO EMBRIONARIO**

Morató R<sup>1</sup>, Albarracín JL<sup>1</sup>, Izquierdo D<sup>2</sup> y Mogas T<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina y Cirugía Animales. <sup>2</sup> Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. 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.

Para ello se han desarrollado diferentes protocolos de congelación lenta (1,2), rápida (3) y ultrarrápida (4) pero ninguno de ellos ha conseguido resultados consistentes. La vitrificación se presenta como una técnica alternativa para la crioconservación de ovocitos ya que permite preservar mejor su compleja estructura (5).

El estadio de maduración nuclear también es un factor que afecta la capacidad de supervivencia del ovocito a la crioconservación. Generalmente, los esfuerzos están focalizados en la crioconservación de ovocitos maduros, pero en este estadio, el proceso induce cambios estructurales que afectan al subsiguiente desarrollo embrionario (6). La elección de un estadio intermedio, como puede ser el estadio de vesícula germinal rota (GVBD), podría permitir reducir los problemas asociados a la crioconservación de ovocitos en estadio de vesícula germinal (GV) o metafase II (MII).

Diferentes trabajos describen una menor capacidad de desarrollo embrionario de los ovocitos procedentes de animales prepúberes respecto a los de animales adultos y lo atribuyen a una falta o incapacidad para completar la maduración citoplasmática. Estudios recientes muestran que si se cultivan los ovocitos antes de la maduración *in vitro* bajo condiciones que bloqueen la reanudación de la meiosis, éstos pueden adquirir mayor capacidad de desarrollo permitiendo a los ovocitos completar dicha maduración (7).

La roscovitina (ROS), un inhibidor específico de la quinasa cdc2, es capaz de inhibir el reanudación meiótica de forma reversible en ovocitos de vaca durante 24 horas sin producir efectos negativos sobre el posterior desarrollo embrionario (8-9).

En este trabajo, se estudió la influencia de un tratamiento de premaduración con ROS previo a la vitrificación de ovocitos de ternera en estadio de GVBD, evaluando su efecto en la supervivencia y la capacidad de éstos 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. (10). Brevemente, se recogieron ovarios de terneras en el matadero y se transportaron al laboratorio en PBS a 37°C. 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 suero fetal bovino (SFB) y 10µg/ml de Epidermal Growth Factor (EGF) durante 24 horas a 38,5°C y con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

Para la fecundación *in vitro*, los ovocitos fueron transferidos a 250  $\mu$ l de medio de fecundación (Medio Tyrode suplementado con 25 mM bicarbonato, 22 mM lactato sódico, 1 mM piruvato sódico, 6 mg/ml albúmina sérica bovina (BSA) y 10  $\mu$ g/ml heparina sódica). Se utilizó semen de toro congelado y los espermatozoides se seleccionaron mediante centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll a 700g durante 8 minutos. Tras el recuento celular, se colocaron 250 $\mu$ l de la suspensión espermática junto con los ovocitos (concentración final:  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml) y se co-cultivaron a 38,5°C y con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

A las 24 horas post-inseminación (hpi), los presuntos cigotos fueron desnudados y transferidos a microgotas de medio SOF suplementado con BSA. Se evaluó el porcentaje de división celular a las 48 hpi, contabilizando los embriones que se encontraban en el estadio de 2-4 células y el desarrollo hasta blastocisto a los 8 días post-inseminación.

**Premaduración con Roscovitina:** La solución stock de roscovitina se preparó a una concentración de 5mM en dimetil sulfóxido (DMSO) y fue alicotada y almacenada a -20°C hasta su uso. Los ovocitos inmaduros fueron premadurados en TCM 199 suplementado con un 10% de SFB, 10 $\mu$ g/ml de EGF y 50  $\mu$ M ROS durante 24 horas a 38,5°C y con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Después del periodo de incubación, los ovocitos fueron lavados en PBS para eliminar el inhibidor y fueron cultivados en medio de maduración durante 24 h más a 38,5°C y con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

**Vitrificación:** A las 6 horas del inicio de la maduración *in vitro*, se vitrificaron los ovocitos mediante la técnica Open Pulled Straw (OPS). Para ello, se siguió el protocolo descrito por Vajta et al. (1998). Brevemente, los ovocitos fueron parcialmente desnudados y depositados en un medio TCM199-Hepes suplementado con un 20% SFB (HM). A continuación, los ovocitos (grupos de 2 a 3) se colocaron en HM suplementado con un 10% de Etilenglicol (EG) y un 10% DMSO durante 30 segundos y fueron transferidos a gotas de 20  $\mu$ l de HM 0.5M de sacarosa y suplementado con un 20% EG y un 20% DMSO. Inmediatamente se realizaron gotas de 1 a 2  $\mu$ l conteniendo los ovocitos que fueron introducidas en las pajuelas de OPS por capilaridad y sumergidas en N<sub>2</sub> líquido. El tiempo entre el contacto de los ovocitos con los crioprotectores de mayor osmolaridad y el N<sub>2</sub> líquido fue inferior a 25 segundos. La descongelación se realizó sumergiendo la punta de la pajuela de OPS directamente en HM suplementado con 0,25 M de sacarosa y los ovocitos se equilibraron 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 18 horas más.

Para evaluar la citotoxicidad provocada por los distintos crioprotectores (CPA), se siguió el procedimiento anteriormente descrito pero sin llegar a sumergir los ovocitos en N<sub>2</sub> líquido.

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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La exposición de los ovocitos de ternera a los CPAs (36,3%) o a la vitrificación (10,6%) en estadio de GVBD disminuyó significativamente el porcentaje de división embrionaria comparado con el grupo control (68,7%). Cuando los ovocitos premadurados con ROS fueron expuestos a los CPAs (13,1%) o vitrificados (1,6%) en estadio de GVBD, el porcentaje de división embrionaria obtenido disminuyó significativamente comparado con los ovocitos control (68,7%) o los ovocitos control-

ROS (56,6%). Tras el cultivo embrionario no se obtuvieron blastocistos de aquellos ovocitos expuestos a CPAs o vitrificados, independientemente de si fueron o no premadurados con ROS.

Men *et al.* (11) obtuvieron blastocistos después de vitrificar ovocitos de vaca en estadio de GVBD mediante la técnica de OPS. En este estudio, el porcentaje de blastocistos obtenido tras vitrificar ovocitos de ternera en estadio de GVBD fue nulo. Estos resultados pueden explicarse por la mayor sensibilidad que tienen los ovocitos de terneras a la vitrificación con respecto a los de vaca, lo cual ya fue descrito en estudios anteriores (12).

Tabla 1. Efecto de un tratamiento de premaduración con ROS (50 $\mu$ M) en la capacidad de desarrollo de ovocitos de ternera en estadio de GVBD después de una exposición a los CPAs o a la vitrificación por OPS.

	n	n (%) de ovocitos	
		División embrionaria	Desarrollo a blastocisto
Control	115	79 (68.7) a	12 (10.4) a
CPA	102	37 (36.3) b	0 (0) b
OPS	113	12 (10.6) c	0 (0) b
ROS-Control	113	64 (56.6) a	7 (6.2) a
ROS+CPA	115	15 (13.1) c	0 (0) b
ROS+OPS	128	2 (1.6) d	0 (0) b

Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas, P<0.05

La hipótesis de que la premaduración *in vitro* bajo condiciones de bloqueo meiótico permitiría a los ovocitos completar la maduración citoplasmática (8,13) nos llevó a pensar que al someter a los ovocitos de ternera a un proceso de premaduración con roscovitina previo a la exposición a los CPAs y a la vitrificación permitiría mejorar su potencial de desarrollo embrionario, y así, la vitrificación en estadio de GVBD podría ser más eficiente debido a las ventajas estructurales para este estadio. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron mejores porcentajes de división ni de desarrollo embrionario comparado con los ovocitos controles.

Los resultados anteriormente descritos indican que la premaduración con roscovitina previa a la vitrificación no tiene un efecto beneficioso en ovocitos de ternera vitrificados en estadio de GVBD mediante la técnica OPS.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lim, JM *et al.* (1992) *Theriogenology* 37:351-61
2. Suzuki, T *et al.* (1996) *Cryobiology* 33:515-24
3. Hoshi, 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. Saunders KM y Parks JE (1999) *Biol Reprod* 61:178-187
7. Fouladi Nashta, AA *et al.* (1998) *Biol Reprod* 59 (2) :255-262.
8. Mermillod, P *et al.* (2000) *Mol Reprod Develop* 55 (1) :89-95.
9. Albarracín, JL *et al.* (2004) *Reprod Dom Anim* 39 (4) :273.
10. Rizos, D *et al.* (2001) *Theriogenology* 56 (1) : 1-16.
11. Men, H *et al.* (2005) *Theriogenology* 57(3):1095-1103.
12. Albarracín, JL *et al.* (2005) *Theriogenology* 63: 890-901.
13. Lonergan, P *et al.* (2000) *Mol Reprod Develop* 57 (2):204-209.