



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero Agrónomo

**Vitrificación de ovocitos equinos: efecto del estado de
maduración sobre el desarrollo embrionario**

Alumno: Eduardo Pablo Urruti Elortegui

Tutor: Ing. Prod. Agrop. Gabriel Clérico

Fecha: 2/3/2020

Nota: 10 (diez)

RESUMEN

La vitrificación en gametas femeninas equinas, podría ser importante como complemento a otras técnicas de reproducción asistida, siendo especialmente beneficiosa en una especie con estacionalidad marcada como es el caso de los equinos. El mayor potencial de utilización de esta técnica sería alargar los periodos de tiempo que transcurren entre la recuperación de los ovocitos y la fecundación *in vitro*, permitiendo además, retrasar la decisión de qué padrillo se utilizará, o bien como estrategia para mitigar la senescencia ovárica y preservar la calidad de los ovocitos. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento, no han permitido expresar el potencial de la técnica, habiendo demostrado un alto nivel de toxicidad, y necesidad de un mayor estudio en los métodos de vitrificación y calentamiento para aumentar la eficiencia en la supervivencia de los ovocitos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial de los ovocitos vitrificados en estadio inmaduro para alcanzar la maduración nuclear, analizar el porcentaje de ovocitos lisados para determinar la viabilidad, y estudiar el desarrollo *in vitro* de ovocitos vitrificados en distintos estadios de maduración. El estudio fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Animal; los complejos cumulus-ovocito (COCs) fueron obtenidos a partir de ovarios post-mortem utilizando la técnica de slicing y raspaje folicular. Aquellos ovocitos seleccionados para ser vitrificados inmaduros, fueron introducidos en diferentes concentraciones de crioprotectores (CPA) y luego cargados en el dispositivo de vitrificación Cryotop® para ser sumergidos en termos de nitrógeno líquido. En el momento de utilización de los ovocitos, se procedió con el calentamiento y fueron sumergidos en concentraciones decrecientes de trehalosa para evitar un shock osmótico y diluir los crioprotectores. Posteriormente, tanto aquellos ovocitos criopreservados inmaduros como los seleccionados para ser vitrificados maduros y el control, fueron madurados *in vitro* en estufa gaseada. Luego de 26 horas de maduración, se evaluó la cantidad de ovocitos lisados, maduros e inmaduros, y se procedió a realizar la técnica ICSI con aquellos que lograron alcanzar el estadio de metafase II utilizando un microscopio invertido Nikon con micromanipuladores y microinyectores. En el día 7 de cultivo post-ICSI, se clasificó a los ovocitos que tuvieron la capacidad de llegar hasta el estadio de blastocito. Los resultados fueron analizados con el programa de Social Science Statistics, utilizando el test de Chi-Square para destacar las comparaciones. Se observó una disminución significativa en la tasa de clivaje de los ovocitos vitrificados respecto al control sin vitrificar, siendo a su vez inferior la tasa para el grupo de Vitrificados MII. No se observó una disminución en la tasa de lisis de ovocitos vitrificados inmaduros luego de madurarlos *in vitro*, ni tampoco se pudo determinar que la maduración se haya visto afectada por el proceso de criopreservación y calentamiento. En conclusión, se pudo determinar que la vitrificación ejerció un efecto negativo sobre los ovocitos, ya que se vio limitada la tasa de división celular una vez fecundados y avanzados en el estadio de maduración. Los resultados además indican que el estadio de MII no sería recomendable para vitrificar ovocitos en las condiciones estudiadas, ya que no fue posible obtener embriones viables.

Palabras claves:

ovocito, vitrificación, *in vitro*, ICSI

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	2
Palabras claves:	2
Índice de imágenes.....	3
Introducción	5
Criopreservación	5
Meiosis en ovocitos equinos	5
Ovogénesis	7
Ciclo estral	9
Crioprotectores	9
Criopreservación en diferentes estadios de maduración	12
Hipótesis.....	14
Objetivos	14
Materiales y métodos	15
Tratamientos	21
Ensayo I	22
Ensayo II	22
Análisis estadístico	22
Resultados	23
Ensayo I	23
Ensayo II	23
Discusión	25
Conclusión	27
Bibliografía	28
Anexos	31

Índice de imágenes

Imagen I: Etapas de la meiosis I y meiosis II.

Imagen II: Niveles hormonales y actividad ovárica durante el ciclo estral de la yegua.

Imagen III: Eliminación de corteza de los ovarios, para visualizar los folículos.

Imagen IV: Previo a realizar la técnica slicing.

Imagen V: Selección de COCs.

Imagen VI: Dispositivo de vitrificación, denominado Cryotop.

Imagen VII: Placa de petri enumerada y Placa universal GPS con medio de THAW.

Imagen VIII: Microscopio invertido Nikon.

Imagen IX: Blastocitos producidos a partir de ICSI

INTRODUCCIÓN

Criopreservación

A principios de la década del 70, comenzó a desarrollarse una técnica denominada transferencia embrionaria, dicha técnica se utiliza actualmente a gran escala en distintas especies animales. Durante sus comienzos, la práctica quirúrgica era la más utilizada, aunque eso producía una menor utilización de la técnica. A partir de los años 80, comenzó un nuevo auge debido fundamentalmente al desarrollo de un protocolo no quirúrgico para la recuperación y posterior transferencia de los embriones a través del cérvix.(Velez, y otros, 2018).

Mediante la transferencia embrionaria, se busca recolectar a través del lavado uterino de una hembra donante, un embrión de entre seis y ocho días post-ovulación. Para poder transferir dicho embrión se requiere de una yegua receptora sincronizada en su ciclo estral con la donante.(Ángel, y otros, 2010)

“La criobiología constituye una rama de la biología cuyo objetivo principal es la conservación de células vivas mediante la utilización de bajas temperaturas, logrando detener los procesos de envejecimiento y degeneración celular” (Vázquez y otros, 1998). Los embriones contienen la información genética completa para el desarrollo del animal adulto, pudiéndose conservar dicho conjunto celular por un tiempo indefinido a través del uso de técnicas especiales de congelación y almacenamiento, que en su conjunto engloban el termino criopreservación. Esta técnica tiene como finalidad mantener el embrión en estado latente, ya que en él se detuvieron todos los procesos biológicos que podrán ser reanimados según el momento en que se lo requiera, sin perder su capacidad de desarrollarse. (Cabrera, y otros, 2006).

En equinos, la criopreservación de embriones se ha extendido con éxito como complemento a la técnica de transferencia embrionaria. Sin embargo, no ha sucedido lo mismo con la criopreservación de gametas femeninas, cuya utilización como complemento a otras técnicas de reproducción asistida podría ser especialmente beneficiosa en una especie con estacionalidad marcada como es el caso de los equinos.

Meiosis en ovocitos equinos

La reproducción sexual involucra dos procesos, la meiosis y la fecundación, que darán origen a la nueva identidad genética de la prole. Las células resultantes de la meiosis, luego de las dos divisiones nucleares sucesivas contienen una sola dotación cromosómica, es decir, un número haploide de cromosomas (n). Luego de la fecundación, el cigoto o huevo producto de la fusión de dos gametos, tendrá una dotación cromosómica doble o número diploide ($2n$). El proceso de meiosis dará origen a un cromosoma para cada célula haploide, proveniente del par de cromosomas homólogos de la célula diploide (Curtis, y otros, 2008).

Previo a la meiosis, los cromosomas se replican y pasan a tener dos cromátidas hermanas idénticas unidas por un centrómero, los cuales van a sufrir un proceso de nuevas combinaciones de material genético debido a la reestructuración de los cromosomas homólogos, mediante el proceso de crossing over o entrecruzamiento. Dicho proceso ocurre durante la profase I de la meiosis, en la que se intercambian segmentos cromosómicos entre los homólogos. Luego, los cromosomas comienzan a separarse, las

cromátidas hermanas dejan de ser idénticas y da como resultado la recombinación del material genético (Curtis, y otros, 2008).

En la meiosis I, la célula pasa por un conjunto de etapas sucesivas, entre ellas se puede diferenciar profase I, metafase I, anafase I y telofase I. Previo a la división nuclear hay una duplicación en el número de cromosomas, esta duplicación del material genético ocurre en la etapa denominada interfase. En la profase I, en complemento con el crossing over, se condensa la cromatina, los centriolos migran hacia los polos y comienza la formación del huso mitótico. Durante la metafase I, los pares de homólogos se ubican en el ecuador de la célula. La etapa anafase I comprende la separación y migración de los cromosomas homólogos desde el ecuador hacia los polos mediante la tracción ejercida por las fibras de huso mitótico. Llegando al final de la meiosis I se encuentra la última etapa, llamada telofase I, en la que las fibras del huso mitótico se dispersan, se forman las nuevas envolturas nucleares alrededor de los dos nuevos núcleos haploides, conteniendo al conjunto de cromosomas descondensados.(Curtis, y otros, 2008)

En la meiosis II, a diferencia de la meiosis I, no hay duplicación del material cromosómico. Las etapas características de esta división nuclear son la profase II, metafase II, anafase II y telofase II. Durante la metafase II, se produce una separación de las cromátidas hermanas. Dando como resultado, la obtención de cuatro células hijas, diferentes entre sí y a la célula madre, con un número haploide de cromosomas.(Helena, y otros, 2008)

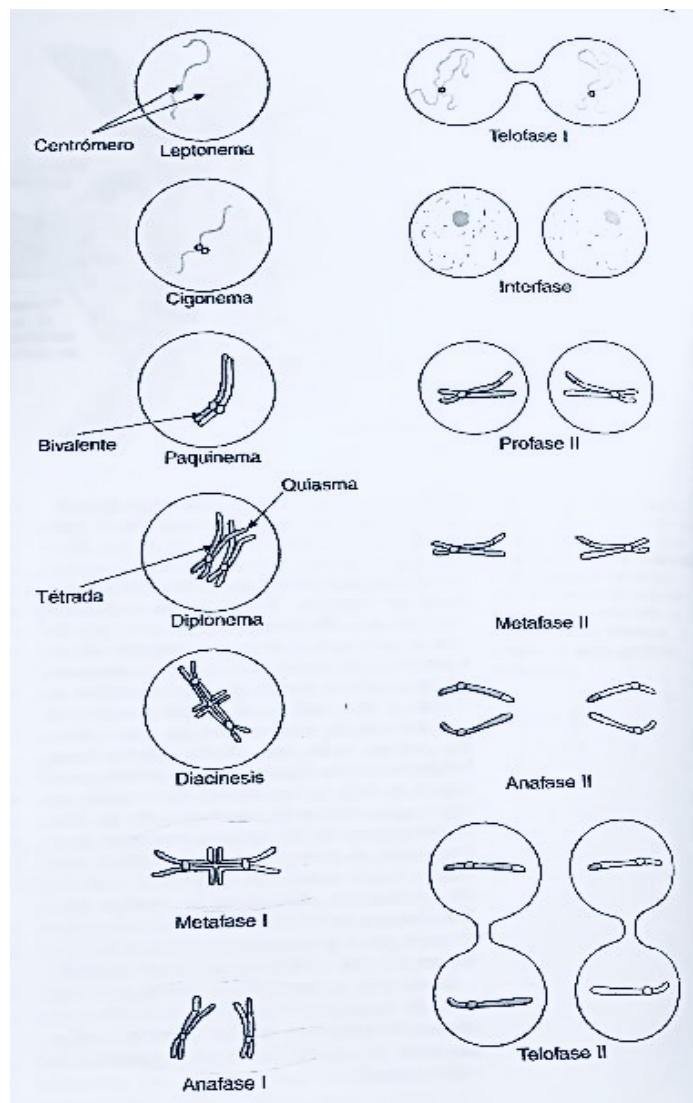


Fig. 1: etapas de la meiosis I y meiosis II. Fuente: Geneser, 2005

Ovogénesis

Se denomina ovogénesis al proceso de formación y desarrollo de la gameta femenina, conocida como ovocito u oocito. Las células germinales primordiales se desarrollan a partir de las paredes del saco vitelino, migran a través del mesenterio y se diferencian con las células del mesonefros dando origen a ovogonias. Las ovogonias se dividen por mitosis durante el desarrollo embrionario dando origen a los ovocitos primarios, aquellos que logran alcanzar el estadio de folículo primordial quedan detenidos en profase I. Durante el desarrollo fetal, las células epiteliales que migran de las paredes del saco vitelino, limitan la cantidad de folículos primordiales que pueden sufrir ovogénesis, quedando así definida la reserva genética. (Gigli, y otros, 2006)

En cuanto a las fases del desarrollo de los folículos (unidades estructurales y funcionales de los ovarios) se diferencian cinco fases denominadas folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y de Graff o preovulatorios. Como se dijo anteriormente, los folículos primordiales se encuentran compuestos de un ovocito cuyo crecimiento ha

sido interrumpido antes del nacimiento. Este se forma durante la vida fetal y su desarrollo posterior para alcanzar la fase de folículo primario, se encuentra regida por factores de crecimiento y las hormonas gonadotrofinas no influyen sobre él. El folículo se encuentra organizado en tres estratos celulares externos al ovocito, los cuales se denominan la capa granulosa, la teca interna y la teca externa. El estrato granuloso deriva de un conjunto de células pre-granulosas que se originan del epitelio ovárico y rodean a los ovocitos I, dando lugar a los folículos primordiales que van a permanecer en estado de profase. Luego las células planas de la granulosa previa a la división por mitosis se diferencian en una capa de células cubicas que rodean al ovocito I, esto da origen a una nueva clasificación llamada folículos primarios. Durante esta fase el ovocito comienza a rodearse de la llamada zona pelúcida, que constituye una capa celular amorfa de glicoproteínas. Las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa. Para que se produzca la formación del folículo secundario, las células de la granulosa aumentan de tamaño y número. Asimismo, las células tecales que rodean por fuera a las células de la granulosa, comenzaran a diferenciarse en una capa externa y otra interna. Los folículos terciarios o antrales están rodeados por varias capas cubicas de células de la granulosa. Éstas comienzan a secretar líquido folicular que, al acumularse, ocasiona un reordenamiento de las células del cúmulo y murales. Durante este estadio, histológicamente se puede apreciar la teca interna constituida por tejido conectivo y la teca externa formada por colágeno, capilares con miofibroblastos que presentaran receptores para la FSH y LH. A estos folículos se los clasifica en dominantes y subordinados. Los folículos subordinados son aquellos que carecen de receptores LH, por lo que no se verán influenciados por dicha hormona. En cambio, los dominantes poseen receptores tanto para LH como FSH. Los folículos preovulatorios o también llamados folículos De Graaf, responden a la LH mediante sus receptores, generando cambios bioquímicos y morfológicos que concluirán desencadenando un reinicio de la meiosis y provocando la ovulación. (Gigli, y otros, 2006)

El ovocito I que se encuentra en el folículo primordial, rodeado de células foliculares, está detenido en estadio de reposo esperando para madurar en la profase I de la meiosis hasta el momento en que el folículo empiece a crecer y madurar, lo cual induce al ovocito I a continuar con las fases de la meiosis. Esta detención es causada por los factores inhibidores de la meiosis del oocito (OMI), sintetizada por las células de la granulosa. La reiniciación de la meiosis es causada por el incremento de la secreción de LH por la hipófisis. (Geneser, 2005)

A partir de la meiosis I, que sufre el oocito I, se originan dos células hijas con número haploide de cromosomas. Al finalizar la meiosis I, ocurre la fase de citocinesis en la cual se produce una división del citoplasma, dando origen a las dos células hijas denominadas oocito secundario y el primer cuerpo polar. Esta división se reparte de forma desigual, ya que la mayor parte del citoplasma permanece con el oocito secundario, mientras que el primer cuerpo polar que posee un tamaño reducido, va a permanecer libre dentro de la cavidad perivitelina que se encuentra entre el oolema y la zona pelúcida (Geneser, 2005).

El núcleo del oocito secundario, luego de la citocinesis, entra en la meiosis II pero se detiene en la metafase, previo a la ovulación. Esta detención en la metafase II es causada por el factor citostático (CSF) sintetizado por el oocito. La segunda división meiótica termina con la formación del segundo cuerpo polar, pero solo en caso de ser fecundado luego de la ovulación. El segundo cuerpo polar también desaparece, al igual que el

primero, dando como resultado de la meiosis II, la generación de un oocito maduro con una dotación simple de cromosomas (n). (Geneser, 2005). En condiciones de laboratorio, donde se procesan folículos de los ovarios obtenidos a partir de yeguas post-mortem en el estadio previo al preovulatorio, se logra la obtención de los oocitos primarios, detenidos como se dijo previamente, en profase de la primera división meiótica. Estos oocitos luego de ser procesados, son incubados en condiciones ya preestablecidas, para lograr la maduración *in vitro* y quedar detenidos en el estadio de metafase II.

Ciclo estral

El intervalo de tiempo entre una ovulación y la otra, se denomina ciclo estral. Este posee dos fases, estro o una fase folicular y diestro o fase luteal. Durante la fase folicular la yegua es receptiva al macho, debido a los altos niveles de estrógeno y bajos niveles de progesterona en sangre. Dicho periodo dura aproximadamente 7 días. (Higuera, 2013).

Una de las características de la dinámica ovárica es que la yegua es poliestrica estacional con fotoperiodo positivo, esto significa que presenta ciclos estrales durante los periodos de mayor cantidad de horas luz. De manera que durante la primavera y verano, donde los periodos de luz aumentan, la yegua tendrá ciclos estrales continuos, en cambio, cuando los días son más cortos, donde la yegua no alcanza a incorporar las horas luz necesarias, no habrá actividad ovárica y por lo tanto se dará origen a la etapa de anestro. (Gigli, y otros, 2006)

El ciclo estral se encuentra regulado por el balance de las hormonas producidas por el hipotálamo, la glándula pineal, la hipófisis, los ovarios y el endometrio. El hipotálamo está encargado de control reproductivo, ya que secreta la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), cuyo efecto es estimular a la hipófisis para la liberación de la hormona folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH), ambas responsables de la dinámica folicular ovárica, la producción de estrógeno, la ovulación y la luteinización del cuerpo lúteo. (Souza, y otros, 2011)

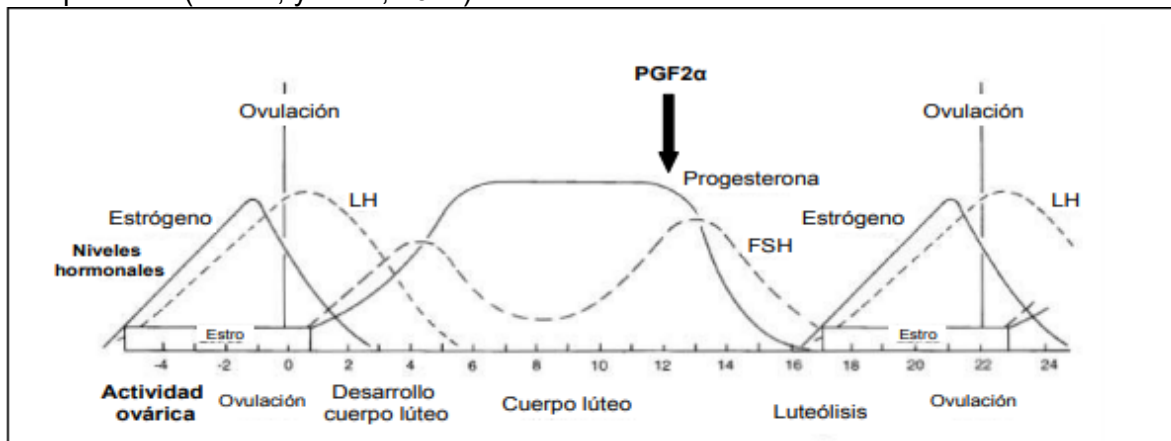


Fig. 2: Niveles hormonales y actividad ovárica durante el ciclo estral de la yegua. Fuente: Higuera, 2013.

Crioprotectores

La membrana plasmática rodea a todas las células. Su capacidad de permeabilidad, permite el intercambio entre el medio intra y extracelular haciendo posible la vida. La membrana ejerce la acción de filtro selectivo para el ingreso y egreso de sustancias,

generando diferencias de concentración entre el interior de la célula y el medio externo. Se encuentra formada principalmente por proteínas unidas por interacciones no covalentes, lípidos que conforman la doble capa y oligosacáridos. (Arrazola, 1994). Los crioprotectores (CPA), sustancias que ayudan a proteger a la célula de los daños que se producen por la criopreservación, son los determinantes en el proceso de congelación y el transporte de agua a través de la membrana plasmática (Calero, 2016). Según las características estructurales de la membrana plasmática, su permeabilidad se relaciona con la temperatura del agua y de los crioprotectores, lo cual permite determinar parámetros y calcular métodos eficientes de adición y eliminación de los mismos, así como también cuantificar la tasa de congelación y descongelación para evitar la formación de hielo intracelular. (Emilia R. Llitas; M. Chong, 2009)

Los crioprotectores se utilizan para provocar una deshidratación parcial de los ovocitos y de esta manera, evitar la formación de cristales que puedan causar daños intracelulares, conocidos como “efecto solución”. Se puede clasificar a los crioprotectores según su grado de penetración en la célula como intracelulares o extracelulares. Los intracelulares son de bajo peso molecular y deshidratan a la célula penetrándola para proteger al citoplasma, siendo los más utilizados glicerol, dimetilsulfoxido, 1-2 propanodiol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol y etanol (Emilia R. Llitas; M. Chong, 2009). En el caso de la especie equina, el agregado de este tipo de crioprotectores a las soluciones vitrificantes mejora la morfología y el porcentaje de células viables luego del descongelado (Castanheira, y otros, 2004). En cambio, los extracelulares son más efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de la membrana, tienen alto peso molecular y extraen el agua libre del interior de la célula a través de la diferencia de presión osmótica pero sin penetrar. Los crioprotectores extracelulares más utilizados son polivinilpirrolidona, polivinil alcohol, glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trehalosa, rafinosa, entre otros azúcares. (Emilia R. Llitas; M. Chong, 2009)

La criopreservación de gametas en edad reproductiva permite la transferencia del potencial biológico de esos ovocitos, de manera que estos se conserven su capacidad para ser utilizados posteriormente. Dichos ovocitos no sufrirán ningún tipo de alteración y podrán utilizarse en el momento de ser requeridos, sin alterar la calidad de vida que posee la yegua progenitora. (Lombardi, y otros). En la especie equina en particular, el mayor potencial de utilización de esta técnica sería para alargar los periodos de tiempo que transcurren entre la realización de las tareas de recuperación de ovocitos y las de fecundación *in vitro*, de esta manera se puede independizar en qué momento ocurren dichas técnicas. Además, permitiría recuperar y acumular ovocitos durante un lapso de tiempo para enviarlos todos juntos al laboratorio, y además retrasar la decisión de qué padrillo se utilizará para la fecundación de dichos ovocitos. Por otro lado, es común que en la cría de equinos deportivos no se conozca el potencial de las yeguas, no solo como jugadoras sino también como progenitoras, hasta una edad avanzada. Teniendo en cuenta que la especie equina presenta senescencia ovárica, la criopreservación de ovocitos en edades tempranas permitiría preservar su calidad y potencial viabilidad.

Es una técnica que posee varios pasos. Como primera medida se expone a las células o tejidos a los crioprotectores, el siguiente paso es el descenso a temperaturas inferiores a cero, ya sea mediante congelación lenta o vitrificación, luego el almacenamiento y finalmente el atemperado para lograr el retorno a la actividad fisiológica propia de la célula, procedimiento que se realiza en conjunto con la dilución y eliminación de los crioprotectores. (Emilia R. Llitas; M. Chong, 2009).

En la congelación lenta se utilizan bajas concentraciones de crioprotectores, cercanas a 1-1.5 M y temperaturas que oscilan entre los -80°C y -196°C . El método consiste en enfriar a la célula paulatinamente, permitiendo que el agua migre al exterior de la misma y alcance un elevado porcentaje de deshidratación. El fluido residual no se congelará ya que posee alta concentración de crioprotectores. De este modo se intenta eliminar la probabilidad de formación de grandes cristales de hielo intracelular y aumentar la posibilidad de supervivencia del ovocito (Calero, 2016). La ventaja que tiene este método a diferencia de la vitrificación es la confiabilidad probada para criopreservar. La principal desventaja, es la necesidad de un congelador celular programable y el tiempo que tarda en congelar la célula, con la consecuente exposición de la célula a los crioprotectores durante largos períodos de tiempo. (Ceballos, y otros, 2018)

Wallach y Trounson (1986) describieron la congelación ultrarrápida o vitrificación. Dicha técnica implica una deshidratación del oocito de forma abrupta, utilizando elevadas concentraciones de crioprotectores, para luego introducirlo en nitrógeno líquido. Se trata de un proceso físico de criopreservación, donde una solución líquida es transformada en un sólido particular amorfo y estable llamado vítreo (Calero, 2016). En dicho proceso se busca producir una solidificación de la solución utilizando altas concentraciones molares de crioprotectores y logrando llegar a temperaturas cercanas a -196°C con tasas de descenso cercanas a los $50.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Una de las ventajas que posee este método es prevención de formación de hielo intracelular, lo cual ayuda a preservar la integridad de la membrana plasmática.(Ceballos, y otros, 2018)

Dentro de sus ventajas podremos encontrar que la vitrificación es un proceso sencillo que no requiere de equipos costosos, ya que el equipamiento que se utiliza no es complejo y también puede llevarse a cabo en poco tiempo. Además no requiere que la yegua donante permanezca sincronizada con la receptora, reduciendo costos de mantenimiento y por otra parte posibilitando que completen su temporada deportiva. Una vez introducido el material en el termo de nitrógeno líquido, puede permanecer allí por un tiempo indefinido (Losinno, 2007).

Por otro lado, dicha técnica posee la capacidad de conducir a la célula a bajas temperaturas a velocidades más rápidas que el congelamiento lento, disminuyendo el tiempo de contacto entre el ovocito y los crioprotectores, y atenuando los efectos tóxicos y osmóticos. También disminuye el riesgo por lesiones que ocurren con la exposición a bajas temperaturas, debido al paso rápido por la zona de temperatura crítica entre -15°C y -60°C . De esta manera se minimiza la posibilidad de lesiones criogénicas y genera la ventaja de no formar de cristales de hielo. (Hurt, y otros, 2000); (Emilia R. Lliteras; M. Chong, 2009)

Una de las grandes desventajas que posee este método es que la concentración elevada de crioprotectores utilizados puede llegar a ser tóxica para las células. La remoción de las altas concentraciones intracelulares del crioprotectores luego del descongelamiento es un problema severo (Guevara, 2016). También formará parte de las desventajas el uso de dispositivos que se requieren para dicha técnica, ya que estos limitan la utilidad de la técnica, porque para cada ovocito recolectado requiere de un dispositivo para poder ser vitrificado (Canesin, y otros, Abril 2017)

Criopreservación en diferentes estadios de maduración

La etapa celular en la que se encuentren los ovocitos al momento de criopreservarlos presenta un tema a discusión. De manera teórica quien nos determinará cuál es la mejor opción, es el mismo citoesqueleto, que de acuerdo al momento madurativo en el que se encuentre la célula poseerá diferentes particularidades.

Hurt y otros (2000) realizaron una comparación acerca de la viabilidad en vitrificación de ovocitos equinos y bovinos obtenidos a partir de ovarios post-mortem, maduros e inmaduros. Luego de la vitrificación, solo el 30% de los ovocitos equinos lograron alcanzar la maduración nuclear y citoplasmática en comparación con el 70% de los ovocitos bovinos, esto nos refleja que ambas especies sobrevivieron a la vitrificación luego de ser madurados *in vitro*. Sin embargo, las tasas de supervivencia fueron más bajas para los equinos que para los bovinos. En los resultados se puede observar que no hubo diferencias significativas en cuanto a maduración nuclear y citoplasmática entre ovocitos vitrificados inmaduros, en MII o el control sin vitrificar, pero hubo una tendencia hacia mayores tasas de supervivencia para ovocitos maduros que ovocitos inmaduros en ambas especies. Los autores concluyen además que los ovocitos criopreservados en estado inmaduro, caracterizados por poseer un citoesqueleto rígido, estarán más expuestos a sufrir daños madurativos y criogénicos. En cambio, los ovocitos en estadio de MII serían más resistentes a la criopreservación que los inmaduros, ya que poseen un citoesqueleto más flexible, y por esta razón estarían menos sujetos al daño criogénico.

En otro estudio realizado por Maclellan *et al.* (2001), se utilizaron ovocitos obtenidos a partir de la maduración *in vivo*, mediante la técnica de aspiración folicular transvaginal, empleando el método Nylop cryolop para la vitrificación. Luego, dichos ovocitos fueron transferidos a yeguas receptoras para realizar la fecundación *in vivo*. El resultado que se obtuvo a partir de dicha investigación, fue que solamente un 12% de los ovocitos continuaron con el desarrollo luego de ser criopreservados, y a partir de ello se logró obtener el primer potrillo vivo a partir de vitrificación de ovocitos en la especie.

Tharasanit *et al.* (2006) examinaron la influencia de la etapa de maduración y las técnicas de criopreservación. Para ello, los ovocitos fueron vitrificados con el método "open pulled straw" (OPS) en la etapa de vesícula germinal (VG; inmaduros), luego fueron calentados, madurados *in vitro* hasta alcanzar la etapa de MII y fecundados mediante la técnica de inyección citoplasmática de espermatozoides (ICSI). Gracias a la realización de dicho análisis se pudo concluir que con el método OPS y el estado de MII de los ovocitos, no se obtuvieron blastocitos, ya que tanto la etapa de maduración como la técnica de vitrificación afectaron la supervivencia de los ovocitos. También afirmó que la tasa de reanudación de la meiosis fue mayor para los ovocitos vitrificados en VG que para congelamiento lento, pero a su vez mucho más bajo que el control.

A partir de yeguas donantes, Maclellan y otros (2010), lograron adquirir ovocitos madurados *in vivo* mediante aspiración folicular transvaginal de folículos preovulatorios (cuando tienen aproximadamente 35mm de diámetro). Los ovocitos en proceso de maduración se incubaron 18 horas extra para alcanzar el estadio de MII y poder ser vitrificados usando el método Cryotop. Luego de ser calentados, los ovocitos fueron fecundados mediante la técnica ICSI. De los folículos aspirados, se logró obtener el 86% de los ovocitos para vitrificar, el 72% de los cuales sobrevivió a la vitrificación y calentamiento y fueron sometidos a ICSI. Luego de 8 días de incubación, 40% de los embriones obtuvo el desarrollo necesario para ser transferidos a yeguas receptoras

(alcanzó el estadio de blastocito), el 26% pudieron generar preñez, las cuales fueron detectadas por ultrasonografía y así se obtuvieron dos potros sanos.

El objetivo del estudio realizado por Ortiz-Escribano y otros (2018) fue comparar dos protocolos de vitrificación para ovocitos inmaduros, uno con bajo tiempo de exposición a elevadas concentraciones de CPA y otro con largo tiempo de exposición a bajas concentraciones de CPA. Además, examinó los efectos del número de capas de células de cúmulos que rodean al ovocito durante la vitrificación. Los ovocitos inmaduros fueron obtenidos de ovarios de matadero mediante la técnica de aspiración, luego vitrificados, calentados y fecundados con ICSI. Se concluyó que el desarrollo de los ovocitos se vio significativamente afectado después de la vitrificación en ambos protocolos, pero solo los ovocitos vitrificados en el protocolo corto mostraron potencial para convertirse en blastocito. El desarrollo de blastocitos solo ocurrió en ovocitos rodeados únicamente por la corona radiata y vitrificados usando el protocolo corto, aunque las tasas de blastocito fueron significativamente más bajas que en el grupo control. Todos los blastocitos obtenidos fueron transferidos el día 9, resultando en una preñez y el nacimiento de un potrillo vivo.

Canesin y otros (2018) realizaron un ensayo en el cual se optó por trabajar y utilizar ovocitos VG, estudiando el comportamiento de los ovocitos en distintas concentraciones de solución de acuerdo al volumen, y también analizando los tiempos de exposición a las mismas en función a las tasas de maduración. De acuerdo a esto obtuvo los tiempos óptimos a los que deberían estar expuestos los ovocitos según las distintas soluciones para disminuir el volumen de vitrificación. Posterior a la adquisición del tiempo óptimo de exposición evaluó tres procedimientos de calentamiento, donde obtuvo un 15% de desarrollo de blastocitos después de la ICSI en la solución escalonada y un 0% en los ovocitos que fueron calentados en una solución altamente hipertónica. Este ensayo determina que los sistemas utilizados todavía muestran un alto nivel de toxicidad y necesita mayor estudio en los métodos de vitrificación y calentamiento para aumentar la eficiencia de esta técnica.

Estudios previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Animal coinciden con lo demostrado por Canesin y otros (2018) y Ortiz-Escribano y otros (2018) en cuanto a las ventajas de limitar el tiempo de exposición de los ovocitos a las soluciones de criopreservación. Asimismo, se obtuvo una mejora en la tasa de embriones logrados al dejar únicamente algunas capas de células del cúmulus rodeando al ovocito previo a la vitrificación. Sin embargo, aún no existe un consenso respecto al estado madurativo óptimo del ovocito que permita obtener mejores resultados globales. Si bien en ensayos citados previamente se obtuvieron buenos resultados al criopreservar ovocitos madurados *in vivo*, los mismos poseen características funcionales y estructurales diferentes a los madurados *in vitro* (Maclellan y otros, 2010). En el siguiente trabajo, se propone evaluar y comparar la capacidad de desarrollo de ovocitos criopreservados en distintos estadios de maduración (VG y madurados *in vitro*) mediante un protocolo con baja tiempo de exposición a crioprotectores.

HIPÓTESIS

Los ovocitos vitrificados en VG utilizando un protocolo de baja exposición a crioprotectores tendrían la capacidad de sobrevivir a la criopreservación y alcanzar el estadio de metafase II luego de 26 a 28 horas de maduración *in vitro*.

Tanto los ovocitos vitrificados en metafase II como aquellos criopreservados inmaduros, podrían conservar su capacidad para ser fecundados mediante ICSI y producir embriones viables.

OBJETIVOS

- 1.1. Comparar la capacidad de los ovocitos vitrificados inmaduros para alcanzar el estadio de MII luego de su calentamiento con respecto al control.
- 1.2. Evaluar la calidad y cantidad de ovocitos recuperados, analizando el porcentaje de lisados para determinar la viabilidad de los mismos.
- 1.3. Estudiar el desarrollo *in vitro* de los ovocitos vitrificados en distintos estadios de maduración con el fin de poder compararlos con los ovocitos control.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio experimental se realizó en el laboratorio de “Reproducción y Biotecnología Animal” de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), Buenos Aires.

Los ovarios fueron extraídos de yeguas provenientes de un frigorífico. Dicho establecimiento se localiza en la ciudad de Mercedes sobre la ruta ° 5, en el kilometro 94,5 y se lo conoce con el nombre de Lamar SA. Se lo eligió por su cercanía al laboratorio, es decir que al estar a corta distancia permitió minimizar los tiempos de traslado de los ovarios desde el momento de la faena, hasta el procesado del material. El encargado de trasportar el material fue un comisionista, quien además procuró que el material llegue en las condiciones óptimas de temperatura, es decir, sin variaciones térmicas y en el menor tiempo posible, utilizando para dicho fin una conservadora isotérmica.

Todo este proceso discurre con la idea de que el tiempo estimado desde la faena hasta el procesamiento sea menor a 4hs, y que previo a cumplirse 8hs desde la extracción de los ovarios los ovocitos puedan introducirse en el holding.

Una vez que el material llegó al laboratorio, se comenzó con el procesamiento de los ovarios equinos. Dentro del laboratorio se procedió a retirar los ovarios de la conservadora isotérmica y se colocaron en un colador previamente esterilizado mediante autoclave al igual que el resto del material utilizado para el procesamiento (Fig. 3). El ovario posee una corteza y ligamentos que lo recubren externamente, de manera que requieren de su extracción para poder trabajar sobre el folículo, esto se realiza mediante la utilización de tijeras.



Fig. 3: Eliminación de corteza de los ovarios, para visualizar los folículos. Fuente: Elaboración propia

Posteriormente, los ovarios fueron lavados con solución fisiológica (NaCl) al 8% para eliminación de sangre y sedimentos. Luego, se los introdujo en vasos de precipitado con solución fisiológica dentro de un baño termostatzado a 32°C con el objetivo de disminuir las fluctuaciones de temperatura durante el procesado. Utilizando como área de trabajo bandejas de vidrio esterilizadas, se procedió a procesar cada ovario individualmente mediante secado completo utilizando toallas de papel, reconocimiento de los folículos procesables y corte individual de los mismos utilizando bisturí n° 24. Según el tamaño que posea cada folículo, se elegirá el tamaño adecuado de la cureta para hueso que se tendrá que utilizar para lograr el desprendimiento de los complejos cumulus ovocito (COCs) de las paredes del folículo. El cureteo de los folículos consiste en raspar todas las paredes del mismo, introduciendo 3 veces la cureta para hueso en el folículo y enjuagando cada vez en un tubo tipo Falcon de 50ml con 15ml de solución TALP (Bavister y Yanagimachi, 1977), suero fetal bovino, y heparina sódica que sirve para evitar la coagulación y como anti aglutinante. Dicho procedimiento se realizó en todos los folículos de hasta 25 mm que se obtuvieron del ovario tratado, hasta llegar a 5ml de pellet en el tubo tipo Falcon.



Fig. 4: Previo a realizar la técnica slicing. Fuente: Elaboración propia.

Una vez finalizado el procesamiento de todos los ovarios obtenidos, se continuó con la búsqueda de los ovocitos. En una placa de petri de 100ml previamente marcada como grilla de búsqueda, se colocó 1ml de pellet y se diluyó en 4ml de TALP, para clarificar y poder identificar los COCs.

En un ambiente oscuro con una lupa estereoscópica a una magnificación de 40x, se seleccionaron los COCs que contengan el citoplasma visiblemente intacto y tres capas de cúmulus como mínimo. Con todo el pellet obtenido se deberá realizar todo el procedimiento previamente mencionado. Para la evaluación morfológica de los ovocitos seleccionados, se tuvo en cuenta el citoplasma homogéneo y oscuro como indicador de buen desarrollo. Además, el número de capas de células del cumulus, que estuvieran compactas entre sí para obtener un mayor porcentaje de viabilidad de los ovocitos.



Fig. 5: Selección de COCs. Fuente: Elaboración propia.

Cada grupo de ovocitos seleccionados fue enjuagado en tres placas de petri de 35mm con medio TALP. Luego de pasar por la última placa de petri fueron transferidos a una nueva placa de petri con medio de holding. Dicho medio está compuesto por 40% TCM 199 con sales de EARLE, 40% TCM 199 con sales de Hank, 20% de suero fetal bovino al y 25 µg/ml gentamicina. Una vez que se introdujo a los ovocitos en el medio de holding, se los dejó a temperatura ambiente (22°-23°C) durante 8 a 18 hs en oscuridad previo a su utilización en alguno de los tratamientos.

Luego del holding, se colocaron los COCs placas de petri de 60mm con medio de maduración previamente equilibrado en incubadora con 6,5% de CO₂ en la atmósfera. El medio de maduración está compuesto por TCM 199 con sales de EARLE, suero fetal bovino al 10%, 25µg/ml de gentamicina, 0,1% v/v de insulina, transferrina, selenio, 1 µmol de piruvato de sodio, 100 µmol de cisteamina y 0,1 m/v FSH. En cada placa de petri de

60mm se realizaron gotas de 100 µl de medio de maduración cubiertas con aceite mineral para evitar su evaporación y en cada una de las cuales se colocaron aproximadamente 10 COCs. Una vez finalizada la carga de los COCs en la placa de petri se lo introdujo en una estufa gaseada durante 28 hs. La estufa se encuentra sesteada a 38,2 °C y posee una concentración de 6,5% de dióxido de carbono, con una humedad al 100%.

Concluidos todos los procesos previos a la técnica de vitrificación, se procedió a realizar la misma, con el fin de conservar el material recolectado. Dicha técnica fue realizada con ovocitos inmaduros luego del holding (sin haber pasado por la maduración *in vitro* mencionada en el paso anterior) y ovocitos maduros. En el caso de los ovocitos vitrificados inmaduros, la maduración fue realizada posteriormente a su criopreservación y calentamiento.

En los ovocitos inmaduros que fueron seleccionados para vitrificación se recortarán parcialmente las capas de cúmulus con la ayuda de un stripper de 275 µm, dejando como máximo 3 capas visibles (Ortiz-Escribano, y otros, 2018). Los ovocitos que fueron madurados previamente, fueron denudados completamente eliminando todas las capas de cúmulos para poder visualizar el primer corpúsculo polar, signo de que el ovocito se encuentra en MII (maduro) El protocolo utilizado es no comercial, que fue desarrollado por Lane y otros (1999) con ciertas modificaciones. A continuación se detallaran los pasos realizados previo a la vitrificación propiamente dicha. Los ovocitos fueron introducidos en diferentes concentraciones de crioprotectores (CPA), utilizando placas de cultivo de embriones Universal GPS® y finalmente fueron cargados en el dispositivo de vitrificación.

- CPA I: (inmersos durante 45 seg) medio compuesto por:
 - 5% Dimethyl sulfoxido (DMSO), que es un liquido orgánico, polar y con propiedades para atravesar rápidamente membranas celulares.
 - 5% Etilenglicol (EG), es un compuesto químico orgánico, con función crioprotectora
 - 3,6 ml de mTCM
- CPA II: (inmersos durante 45 seg) medio compuesto por:
 - 10% DMSO
 - 10% EG
 - 3,2 ml de mTCM
- CPA III: (inmersos durante 30 seg) medio compuesto por:
 - 20% DMSO
 - 20% EG
 - 2,4 ml de mTCM
 - 0,998 gr de Trehalosa (0,65M)

El contenido del mTCM es de 18ml TCM 199 con sales de Hanks, 2ml de SFB y 20µl de Gentamicina.

Luego de que los ovocitos pasaran por las diferentes concentraciones de crioprotectores en grupos de hasta 4 ovocitos, fueron cargados en el dispositivo de vitrificación Cryotop®, (previamente rotulado) e inmediatamente sumergidos en un contenedor con nitrógeno líquido. Finalmente, los Cryotop® fueron transferidos a termos de nitrógeno líquido para conservarse hasta su utilización.



Fig. 6: Dispositivo de vitrificación Cryotop®. Fuente: Elaboración propia.

En caso de querer utilizarse dichos ovocitos se los deberá someter a un proceso de calentamiento que consta de tres pasos, cada uno con concentraciones decrecientes de trehalosa para evitar un shock osmótico y diluir los crioprotectores simultáneamente.

Los pasos de calentamiento son:

- THAW I: (inmersos durante 60 seg) en un medio compuesto por:
 - 3 ml de mTCM
 - 0.25 M trehalosa
- THAW II: (inmersos durante 60 seg) en un medio compuesto por:
 - 3 ml de mTCM
 - 0.188 M trehalosa
- THAW III: (inmersos durante 60 seg) en un medio compuesto por:
 - 3 ml mTCM
 - 0.125 M trehalosa

Utilizando 3 pocillos de placas para embriones universal GPS, se colocó cada uno de los medios de calentamiento, con el fin de que los ovocitos se encuentren un minuto en cada pocillo. Luego de los 3 minutos, los ovocitos fueron incubados durante 90 min en medio de cultivo sin hormonas dentro de la incubadora para estabilizar el citoesqueleto y las organelas. Una vez concluido el proceso de calentamiento, los ovocitos inmaduros

fueron ingresados en maduración *in vitro*, y aquellos criopreservados en MII fueron directamente fecundados mediante la técnica de ICSI.

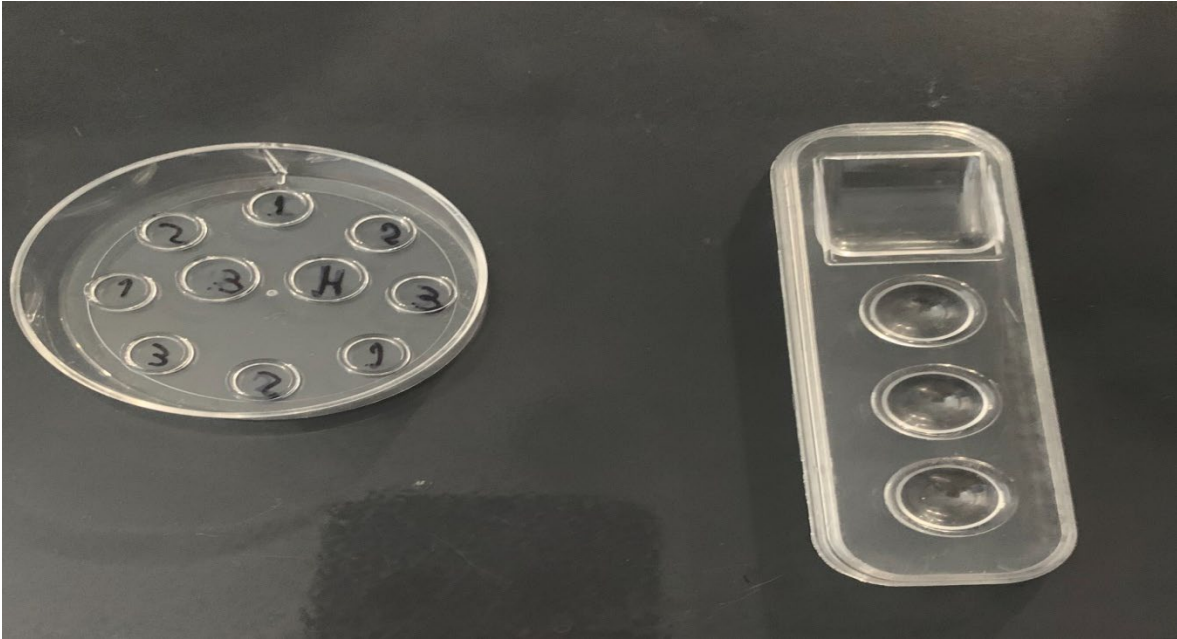


Fig. 7: Placa de Petri enumerada (izquierda) y Placa universal GPS con medio de THAW (derecha). Fuente: Elaboración propia.

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI por sus siglas en inglés) descrita por Palmer y colaboradores, se realizó utilizando semen de un padrillo con fertilidad comprobada para ICSI. El semen se encuentra en pajuelas inmersas en el nitrógeno líquido, se cortó la misma para poder utilizar un decimo. El corte se realizó sin sacar la pajuela del termo, para evitar shock térmico que cause la muerte de los espermatozoides. Luego la fracción cortada se introdujo en el tubo tipo falcón de 50ml, con 4 ml de TALP durante 15 minutos a 38°C, donde se realizó el calentamiento del mismo.

La inyección intracitoplasmática se ejecutó con un microscopio invertido Nikon, con micro manipuladores y micro inyectores que permitieron efectuar las inyecciones. En una placa de Petri para ICSI se introdujo una gota de PVP donde se colocó 1 µl de la sección superior del medio con espermatozoides, conteniendo aquellos que se encuentran más activos y con movilidad, en 3 µl de polivinil pirrolidona (PVP) y alrededor un grupo de 8 gotas con medio TALP donde se colocaron los ovocitos a inyectar y se procedió a la fecundación.



Fig. 8: Microscopio invertido Nikon, con micro manipuladores. Fuente: Elaboración propia.

Una vez realizada la técnica ICSI, se colocara a los ovocitos inyectados, en una placa de petri, con un medio compuesto por 54% DMEM F12, 40% Global Total, 6% suero fetal bovino y gentamicina para enviarlos a incubar. La incubación se realiza en una incubadora gaseada, que fue previamente acondicionada con una concentración de 5% de dióxido de carbono, 5% de oxígeno y 90% de nitrógeno gaseoso.

Los ovocitos pertenecientes al grupo de inmaduros que primero fueron vitrificados y luego madurados, se realizó la técnica de ICSI, en conjunto con el grupo control y finalmente los dos grupos se introdujeron en la incubadora gaseada. A la semana siguiente el grupo de ovocitos que fueron madurados previamente y luego vitrificados, se realizó la técnica ICSI en conjunto con su grupo control sin vitrificar y se colocaron en la incubadora gaseada. De esta manera se realizaron durante seis semana sucesivas, tres repeticiones para cada tratamiento en conjunto con su grupo control.

En el día 5 post-ICSI, se procedió a cambiar el medio de cultivo, con el fin de renovarlo y corroborar cuales de aquellos ovocitos comenzaron con la división celular respecto al total de inyectados (tasa de clivaje). Desde el día 7 hasta el día 10 de realizada la inyección intracitoplasmática, se clasificó a los ovocitos que tuvieron la capacidad de llegar hasta el estadio de blastocito, con el fin de poder cuantificarlos.

Tratamientos

Los ovocitos fueron asignados aleatoriamente a cada uno de los tratamientos, grupo control, grupo inmaduros y grupo maduros. Según el momento en el cual fueron seleccionados mediante la lupa estereoscópica 40x, se colocaron en la placa de petri y se enviaron al tratamiento correspondiente para cada grupo.

Ensayo I

Se evaluó la influencia de la vitrificación de los ovocitos equinos, con el fin de determinar el impacto que generó la misma en los diferentes estadios de maduración.

Ensayo II

Una vez vitrificados y realizada la técnica ICSI, se cuantificó la cantidad de ovocitos que estaban en condiciones de seguir con el desarrollo y división celular para alcanzar el estadio de ovocitos clivados y luego el de blastocitos.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa de Social Science Statistics, utilizando el test de Chi-Square para destacar las comparaciones. Se consideró que hubo diferencia significativa en un nivel de p-valor $< 0,05$.

RESULTADOS

Ensayo I

	n	Lisados (%)	MII (%)	Inmaduros (%)
Control sin vitrificar	490	224/490 (46)	257/490 (52)	9/490 (2)
Vitrificados Inmaduros	99	52/99 (52)	43/99 (43)	4/99 (4)

En el análisis del ensayo I, se puede observar que la vitrificación no fue un factor de relevancia en la tasa de ovocitos lisados luego de 26 a 28 horas de maduración *in vitro*, esto es debido a que los resultados no demostraron diferencias significativas (p -valor < 0.05) entre el control sin vitrificar y los vitrificados inmaduros.

En cuanto a los ovocitos que lograron alcanzar el estadio de MII, los cuales podrían ser fecundados, fue similar entre sí, sin encontrar diferencias significativas (p -valor < 0.05) entre el control sin vitrificar y los vitrificados inmaduros.

Ensayo II

	N° inyectados	Clivados (%)	Blastocitos (%)
Control sin vitrificar	199	156/192 ^A (81)	32/192 (16)
Vitrificados Inmaduros	39	25/39 ^B (64)	7/39 (18)
Vitrificados MII	99	41/99 ^C (41)	0

En el análisis del ensayo II, evaluando la cantidad de ovocitos inyectados mediante la técnica ICSI, se observó diferencias significativas (valor p < 0.05) entre los ovocitos control, los vitrificados inmaduros y los vitrificados en MII para la tasa de clivaje. Se puede determinar que la vitrificación ejerció un efecto negativo sobre los ovocitos, ya que se vio limitada la tasa de división celular una vez fecundados y avanzados en el estadio de maduración.

Los blastocitos son los embriones que alcanzaron la diferenciación celular en células del trofoblasto y el macizo celular. Las primeras son las encargadas de la formación de la placenta y las segundas son el embrión propiamente dicho. Estos embriones una vez transferidos a yeguas receptoras, previamente sincronizadas, tendrán la capacidad de generar preñeces. En cuanto al porcentaje embriones que alcanzaron dicho estadio, no se encontraron diferencias significativas (valor $p < 0.05$) entre el control y los vitrificados inmaduros. Los ovocitos vitrificados en MII no fueron comparados debido a que ninguno logró alcanzar el estadio de blastocito luego de la fecundación.

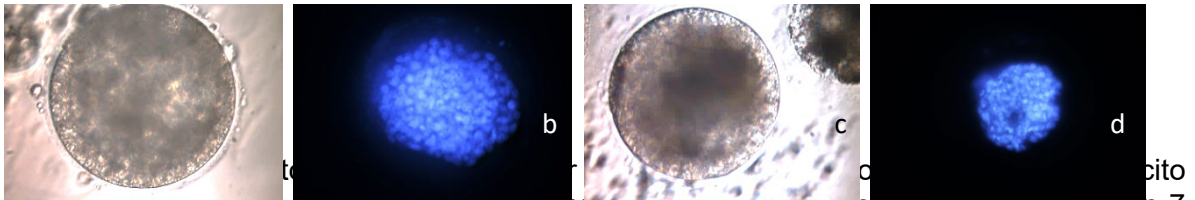


Figura 1. Embrión de control (a) y vitrificado utilizando el protocolo corto (c). B y D) tinción con Hoechst de embriones con 7 días de cultivo post-ICSI correspondientes a los embriones A y C respectivamente.

DISCUSIÓN

Los experimentos realizados en el ensayo I, con el fin de evaluar el efecto de la vitrificación sobre la tasa de lisados y maduración, no tuvieron diferencias significativas (p -valor < 0.05). Si bien la tasa de ovocitos lisados obtenida fue elevada comparada al trabajo realizado por Hurt y otros (2000), en la que sostiene que en promedio uno de cada tres ovocitos equinos posee citoplasma encogido luego de la recolección de ovarios, se debe tener en cuenta que la misma no fue corroborada sino hasta luego de la vitrificación y maduración *in vitro*, y no inmediatamente post-recolección como en dicho trabajo. En términos generales, podría decirse que la vitrificación de ovocitos inmaduros no generó respuestas negativas significativas, lo cual puede deberse, como se menciona en el trabajo realizado por Hinrichs y otros (2005), a que los mismos no tienen los microtúbulos organizados en el huso, y por lo tanto disminuye el riesgo de alteraciones cromosómicas ya que la cromatina se encuentra descondensada y protegida por la envoltura nuclear.

En el presente ensayo, a diferencia del trabajo realizado por Tharasanit y otros (2006), se obtuvieron mayores tasas con respecto a los ovocitos que alcanzaron el estadio MII, debido probablemente a la utilización de diferentes protocolos de vitrificación y también de maduración *in vitro*, logrando obtenerse en nuestro ensayo un 43% para ovocitos vitrificados inmaduros vs. 28 % logrado por Tharasanit y otros (2006). Sin embargo, se debe destacar que en ambos trabajos no se obtuvieron diferencias significativas (p -valor < 0.05) entre ovocitos control y los vitrificados inmaduros respectivamente. Otro trabajo realizado previamente, menciona que las tasas de maduración *in vitro* después de la vitrificación son menores al 20% (Hochi, y otros, 1994) (Hochi, y otros, 1996), a diferencia del presente ensayo (43%) y que se compara desfavorablemente con 60-80% reportado para ovocitos sin vitrificar (Hinrichs, 1998).

Los experimentos realizados en el ensayo II, con el fin de evaluar la respuesta a la vitrificación según el estadio de maduración de los ovocitos equinos, mostraron diferencias significativas para la tasa de clivaje. Para los ovocitos que lograron alcanzar el estado de blastocito, solo se obtuvieron datos del control sin vitrificar y los vitrificados inmaduros pero sin diferencias significativas (p -valor < 0.05) entre ambos.

En el estudio realizado por Tharasanit y otros. (2006), los ovocitos fueron madurados hasta alcanzar el estadio de MII, vitrificados y luego calentados. Al igual que el presente trabajo, no se lograron obtener blastocitos. Dentro de los factores relacionados con la técnica de vitrificación, la utilización de elevadas concentraciones de crioprotectores podría afectar de manera diferencial a los ovocitos vitrificados en MII y ser un factor determinante en la tasa de supervivencia de los ovocitos, como así también la remoción de estas concentraciones luego del calentamiento (Guevara, 2016).

Los ovocitos maduros se caracterizan por tener organizados los cromosomas por el huso, el cual es sensible a daños criogénicos que pueden causar alteraciones en el ADN y la posterior detención en el desarrollo (Sterziky, y otros, 1992; Ishida, y otros, 1997; Berthelot-Ricou, y otros, 2011). En el experimento realizado por Maclellan y otros (2010), se logró la obtención de blastocitos a partir de ovocitos madurados *in vivo*, los cuales podrían tener mayor capacidad de tolerar la criopreservación y reorganizar el citoesqueleto luego del calentamiento comparados a ovocitos madurados *in vitro*. En total, el 40% de los ovocitos obtuvo el desarrollo necesario para blastocito el día 8 y se lograron obtener dos potros sanos.

Un ensayo publicado recientemente podría dar una explicación posible a los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a la tasa de clivaje y la capacidad de madurar *in vitro* luego del calentamiento de los ovocitos vitrificados en GV. En el mismo, se logró demostrar que la vitrificación reduce la capacidad de completar la maduración nuclear a causa de una reducción en la longitud y ancho del huso por un desbalance proteico en el mismo, acompañado por una mayor cantidad de errores cromosómicos por una mala alineación y dispersión del ADN. Si bien a diferencia del ensayo citado, en el presente trabajo la tasa de maduración de ovocitos post-calentamiento fue menor al control aunque no significativamente, la disminución en la tasa de clivaje post-fecundación podría ser un indicador de daño durante la vitrificación que permitió alcanzar el estadio de MII pero afectó la posterior viabilidad de los ovocitos.

La tasa de blastocitos obtenida a partir de ovocitos inmaduros vitrificados no tuvo diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0.05$) con respecto al control, siendo el primer reporte en la literatura de tasas de desarrollo semejantes al control utilizando ovocitos sin vitrificar. Si bien en los trabajos de Ortiz-Escribano y otros (2018) y Canesin y otros (2018) se menciona la obtención de blastocitos a partir de ovocitos vitrificados inmaduros, las tasas fueron significativamente más bajas que el control. Este resultado podría explicarse por el menor tiempo de exposición a crioprotectores utilizándose el protocolo de nuestro laboratorio. (Bavister, y otros, 1977)

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten concluir que la vitrificación no afectaría negativamente el desarrollo de ovocitos criopreservados en GV en términos de maduración y porcentaje de lisis post-maduración *in vitro*. Sin embargo, al evaluar el efecto de la vitrificación sobre el desarrollo embrionario luego de la fecundación mediante ICSI, se observaron diferencias en la tasa de clivaje. Esto nos llevó a determinar que la vitrificación posiblemente genere cambios morfológicos y/o en la funcionalidad de las organelas en ovocitos que, si bien permitirían reanudar normalmente la meiosis, serían un impedimento para su correcta fecundación *in vitro*.

Por otro lado, el hecho de no haber observado diferencias significativas en la tasa de embriones que llegaron hasta el estadio de blastocisto, representa un avance importante en la aplicación de la técnica, con la cual hasta la fecha no se han reportado tasas de desarrollo que no difieran del control con ovocitos frescos. Sería importante para futuros ensayos tener la capacidad de evaluar la calidad y viabilidad de los embriones obtenidos, sea mediante transferencia de los mismos a receptoras sincronizadas o bien mediante tinciones diferenciales que permitan evaluar por ejemplo el número de células y apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

Ángel D, Bran J. Reproducción asistida en equinos: aportes desde la teoría [Publicación periódica] // Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, vol. 5, núm. 1. - 2010. - págs. 56-69.

Arrazola A. Biología de la membrana celular [Publicación periódica] // NEFROLOGIA. Vol. XIV. Núm. 4.. - 1994. - págs. 418-425.

Ávila-Portillo L, [y otros] FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN [Publicación periódica] // Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4. - 2006. - págs. 291-300.

Ávila-Portillo L, [y otros] FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN [Publicación periódica] // Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4. - 2006. - págs. 291-300.

Bavister B, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. [Sección del libro] // Biol. Reprod. 16. - 228–237 : [s.n.], 1977.

Cabrera P, Fernández A. Criopreservación de embriones: una herramienta básica en la Reproducción asistida [Publicación periódica] // Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV, vol. 47, núm. 2. - 2006. - págs. 59-69.

Calero G. DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL [En línea]. - mayo de 2016. - 13 de 9 de 2019. - <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.

Canesin H, [y otros] Desarrollo de blastocistos después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides de ovocitos equinos vitrificados en la etapa de la vesícula germinal. - Abril 2017. - págs. 52-59.

Canesin H, [y otros] Vitrification of germinal-vesicle stage equine oocytes: Effect of cryoprotectant exposure time on in-vitro embryo production [Informe]. - Collage Station, USA : Cryobiology (2018), 2018.

Castanheira P, [y otros] CRYOPRESERVATION OF EQUINE EMBRYOS BY [Informe]. - Rio de Janeiro, Brasil : M. Alvarenga and J. F. Wade, 2004.

Ceballos J, [y otros] Biblioteca Digital Lasallista [En línea]. - 2018. - 9 de 9 de 2019. - <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/handle/10567/2122>.

Curtis H, [y otros] Curtis.Biología [Libro]. - Buenos Aires , Argentina : medica panamericana, 2008.

Ducheyne K, [y otros] Vitrifying immature equine oocytes impairs their ability to correctly align the chromosomes on the MII spindle [Sección del libro] // *Reproduction, Fertility and Development*. - 2019.

Geneser F. Histología [Libro]. - CABA : panamericana SA, 2005.

Gigli I., [y otros] Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos [Publicación periódica] // *InVet*, vol. 8, núm. 1, diciembre. - 2006. - págs. 183-203.

Guevara Zarate O. Comparacion de dos metodos de criopreservacion de ovocitos bovinos. - Veracruz : Universidad Veracruzana, 2016.

Higuera MP. bdigital [En línea]. - 2013. -
<http://bdigital.unal.edu.co/39461/1/07780191.2013.pdf>.

Hinrichs Producción de embriones por reproducción asistida en el caballo [Sección del libro] // *Theriogenology*. - [s.l.] : 49, 1998.

Hochi S, [y otros] Criopreservación de ovocitos equinos por congelación en 2 pasos. - [s.l.] : 42, 1994. - págs. 1085-1094.

Hochi S, [y otros] En observación de microscopía electrónica de maduración y transmisión in vitro de ovocitos de caballo después de la vitrificación.. - [s.l.] : 33, 1996. - págs. 300-310.

Hochi S, [y otros] Efecto de las etapas nucleares durante la MIV en la supervivencia de ovocitos vitrificados [Sección del libro] / aut. libro *Theriogenology*. - 1998.

Hurt A.E. [y otros] VITRIFICATION OF IMMATURE AND MATURE EQUINE AND BOVINE OOCYTES IN AN ETHYLENE GLYCOL, FICOLL AND SUCROSE SOLUTION USING OPEN-PULLED STRAWS . - [s.l.] : Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University , 2 de febrero de 2000.

Llitas E, Chong M. Avances en la criopreservación de ovocitos [Publicación periódica] // *Ciencia y Tecnología Ganadera* Vol. 3 No. 1. - 2009. - págs. 1-13.

Lombardi E, Sícario L. Preservación de la fertilidad [Publicación periódica] // *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*. - págs. 44-55.

Losinno L. AVANCES EN LA APLICACIÓN DE BIOTECNOLOGÍAS [Informe]. - Universidad Nacional de Río Cuarto : VII Simposio Internacional de reproducción animal, 2007.

Maclellan L.J. [y otros] Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares [Informe]. - Fort Collins : *Theriogenology*, 2001.

Maclellan L.J. [y otros] Vitrification, warming, ICSI and transfer of equine oocytes matured in vivo [Informe]. - Fort Collins, USA : *Animal Reproduction Science* 121S (2010) S260–S261, 2010.

Ortiz-Escribano N. [y otros] An improved vitrification protocol for equine immature oocytes, resulting in a first live foal [Informe]. - [s.l.] : EVJ-GA-16-266.R3, 2018.

Otoi T, [y otros] Fertilización in vitro y desarrollo de crioprecios de ovocitos inmaduros y maduros servido por etilenglicol con sacarosa [Sección del libro] / aut. libro Criobiología. - 1995.

Souza Andrade F, [y otros] scielo [En línea]. - 22 de Julio de 2011. - 31 de Agosto de 2019. - <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n22/n22a05.pdf?>.

Tharasanit T, [y otros] Effect of Maturation Stage at Cryopreservation on Post-Thaw Cytoskeleton Quality and Fertilizability of Equine Oocytes [Informe]. - Netherlands : MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 73:627–637 (2006), 2006.

Velez C, [y otros] Biblioteca Digital Lasallista BIDILA [En línea]. - 2018. - 31 de agosto de 2019. - <http://hdl.handle.net/10567/2122>.

Wallach E. E. y Trounson A. Preservation of human eggs and embryos. Fertility and Sterility [Sección del libro]. - 1986.

ANEXOS

Tabla I: Comparación en la tasa de maduración entre Control vs Vitrificados inmaduros. Fuente: elaboración propia

	Maduración	
	Si	No
Control (sin vitrificar)	257	9
Vitrificado inmaduro	43	4

	Si	No	Totales de fila marginal
Controlar	257 (254,95) [0,02]	9 (11.05) [0.38]	266
Vitrificado Inmaduro	43 (45.05) [0.09]	4 (1.95) [2.15]	47
Totales de columna marginal	300	13	313 (Gran total)

La estadística de chi-cuadrado es 2.6376. El valor p es .104358. Este resultado *no* es significativo en $p < .05$.

La estadística de chi-cuadrado con corrección de Yates es 1.5069. El valor p es .219611. *No* significativo en $p < .05$.

Tabla II: Comparación en la tasa de lisados entre Control vs Vitrificados inmaduros. Fuente: elaboración propia

	Lisados	
	Si	No
Control	224	266
Vitrificado inmaduro	52	47

	Si	No	Totales de fila marginal
Controlar	224 (229,61) [0,14]	266 (260,39) [0,12]	490
Vitrificado Inmaduro	52 (46,39) [0,68]	47 (52,61) [0,6]	99
Totales de columna marginal	276	313	589 (Gran total)

La estadística de chi-cuadrado es 1.5343. El valor p es .215468. Este resultado *no* es significativo en $p < .05$.

La estadística de chi-cuadrado con corrección de Yates es 1.273. El valor p es .25921. *No* significativo en $p < .05$.

Tabla III: Comparación en la tasa de clivaje entre Control vs Vitrificados inmaduros.
Fuente: elaboración propia

	Clivaje	
	Si	No
Control	156	36
Vitrificado inmaduro	25	14

	Si	No	Marginal Row Totals
Control	156 (150.44) [0.21]	36 (41.56) [0.74]	192
Vitrificado Inmaduro	25 (30.56) [1.01]	14 (8.44) [3.66]	39
Marginal Column Totals	181	50	231 (Grand Total)

The chi-square statistic is 5.6199. The p -value is .017758. This result is significant at $p < .05$.

The chi-square statistic with Yates correction is 4.6543. The p -value is .030976. Significant at $p < .05$.

Tabla IV: Comparación en la tasa de Clivaje entre Control vs Vitrificados en MII.
Fuente: elaboración propia

	Clivaje	
	Si	No
Control	156	36

Vitrificado en MII	41	58
--------------------	----	----

	Si	No	Marginal Row Totals
Control	156 (129.98) [5.21]	36 (62.02) [10.92]	192
Vitrificado MII	41 (67.02) [10.1]	58 (31.98) [21.17]	99
Marginal Column Totals	197	94	291 (Grand Total)

The chi-square statistic is 47.4006. The p -value is . This result is significant at $p < .05$.

The chi-square statistic with Yates correction is 45.5964. The p -value is . Significant at $p < .05$.

Tabla V: Comparación en la tasa de clivaje entre Vitrificados inmaduros vs Vitrificados en MII. Fuente: elaboración propia

	Clivaje	
	Si	No
Vitrificado inmaduro	25	14
Vitrificado en MII	41	58

	Si	No	Totales de fila marginal
Vitrificados inmaduros	25 (18.65) [2.16]	14 (20.35) [1.98]	39
Vitrificado MII	41 (47.35) [0.85]	58 (51.65) [0.78]	99
Marginal Column Totals	66	72	138 (Grand Total)

The chi-square statistic is 5.7718. The p -value is .016285. This result is significant at $p < .05$.

The chi-square statistic with Yates correction is 4.8984. The p -value is .026882. Significant at $p < .05$.

Tabla VI: Comparación en la tasa de blastocitos entre Control vs Vitrificados inmaduros. Fuente: elaboración propia

	Blastocito	
	Si	No
Control	32	160

Vitrificado inmaduro	7	32
----------------------	---	----

	Si	No	Marginal Row Totals
Control	32 (32.42) [0.01]	160 (159.58) [0]	192
Vitrificado Inmaduro	7 (6.58) [0.03]	32 (32.42) [0.01]	39
Marginal Column Totals	39	192	231 (Grand Total)

The chi-square statistic is 0.038. The p -value is .845507. This result is *not* significant at $p < .05$.

The chi-square statistic with Yates correction is 0.0016. The p -value is .968428. *Not* significant at $p < .05$.

Tabla VII: Comparación en la tasa de blastocitos entre Control vs Vitrificados MII.
Fuente: elaboración propia

	Blastocito	
	Si	No
Control	32	160
Vitrificado en MII	0	99

Tabla VIII: Comparación en la tasa de blastocitos entre Vitrificados inmaduros vs Vitrificados en MII. Fuente: elaboración propia

	Blastocito	
	Si	No
Vitrificado inmaduro	7	32
Vitrificado en MII	0	99