

SOBREVIVENCIA DE BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO VITRIFICADOS EN DISPOSITIVOS VITRI-TIP Y VITRI-TOP

Survival of bovine blastocysts produced in vitro and vitrified in vitri-tip and vitri-top devices

Rosa Condori, Carlos Quispe, Edith Ancco, Deysi Dipaz, Edwin Mellisho

Laboratorio de Biotecnología
Reproductiva, Departamento de
Producción Animal, Facultad de
Zootecnia, Universidad Nacional
Agraria La Molina, Lima-Perú.

* Corresponding author
Rosa Condori
E-mail: rosycc229@gmail.com

ABSTRACT

Vitrification is a new technique that has many potential advantages in mammalian oocytes and embryos. In the present work, the objective was to compare of post thawing survival rate by of blastocysts vitrified in vitro in two devices. Standardized procedure at the Laboratory of Reproductive Biotechnology, UNA La Molina was used in the experimental part, to produce in vitro bovine embryos from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries. The viable oocytes were incubated at 38.5 ° C and 5% CO₂ in 10 oocytes/group microdroplet (70 µl) covered with mineral oil, for 22 to 24 hours in maturation medium, 18 hours in fertilization medium and 7 days in culture medium. A total of 100 expanded blastocysts produced bovine day 7 of culture were used. Blastocysts were vitrified in Vitri-tip (n = 50) and Vitri-top (n= 50) devices, using standard media (Vitrogen®, Brazil) on vitrification, thawing and culture in vitro. Once thawed blastocysts from both groups were cultured in vitro for 3 hours at 38.5 ° C, 5% CO₂ and 90% Hd. The comparison of both groups was performed using the statistical test Chi-square and using a significance level of 5%. No statistically significant differences (P>0.05) in the re-expansion rates in vitro post thawing between both devices during vitrification were observed post thawing survival rate, 52% (24/46) Vitri-tip and 48% (21/44) Vitri-top devices. Devices using vitrification closed in bovine embryos, can achieve low loss rate in low volume management, although the embryonic survival was not very impressive.

Keywords: Bovine, blastocyst, vitrification, desvices.

RESUMEN

La vitrificación es una nueva técnica que tiene muchas ventajas potenciales en ovocitos y embriones de mamíferos. En el presente trabajo, el objetivo fue comparar la tasa de sobrevivencia por re-expansión a 3 horas post descongelamiento de los blastocistos, in vitro vitrificados en dos dispositivos elaborados en el laboratorio. En el experimento, se utilizó el procedimiento estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, UNA La Molina, para producir embriones bovinos in vitro, a partir de ovocitos recuperadas de ovarios de vacas sacrificadas en matadero. Los ovocitos viables fueron incubados a 38.5°C y 5% CO₂ en grupos de 10 ovocitos en microgotas de 70 µl cubiertas con aceite mineral, por 22 a 24 horas en medio de maduración, 18 horas en medio de fecundación y 7 días en medio de cultivo. Se utilizaron un total de 100 blastocistos expandidos bovinos producidos al día 7, de cultivo in vitro. Los blastocistos fueron vitrificados en dos dispositivos Vitri-top (n=50) y Vitri-tip (n=50), utilizando medios comerciales (Vitrogen®, Brasil) en la vitrificación, descongelación y cultivo in vitro. Una vez descongelados los blastocistos de ambos grupos fueron cultivados in vitro por 3 horas a 38.5°C, 5% CO₂ y 90%Hd y la comparación de ambos grupos se realizaron mediante la prueba estadística Chi-cuadrado y utilizando un nivel de significancia del 5%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) en las tasas de re-expansión in vitro postdescongelación entre ambos dispositivos durante la vitrificación, observándose 52% (24/46) con el uso de dispositivo Vitri-tip y 48% (21/44) Vitri-top. El uso de dispositivos de vitrificación cerrados en embriones bovinos permite lograr una baja tasa de pérdidas por manejo de bajo volumen, aunque la sobrevivencia embrionaria no fue muy impactante.

Palabras clave: Bovino, blastocistos, vitrificación, dispositivos.

INTRODUCCION

La biotecnología aplicada en la reproducción animal ha logrado grandes avances en los últimos años, desarrollando métodos de reproducción asistida en diversas especies de animales. Siendo, las que destacan la transferencia de embriones, producción de embriones in vitro y la micromanipulación de embriones, lográndose obtener un incremento en cuanto al número de embriones por animal de alto valor genético a bajo costo y salvar algunas limitaciones reproductivas en algunas especies.

Con los avances de la biotecnología, la criopreservación de embriones ha ofrecido nuevas perspectivas y ha crecido de la mano a la producción y la transferencia embrionaria. Siendo la vitrificación uno de los métodos más simples y modernos de criopreservación, fue descrito por primera vez por Rall y Fahy (1985) y presenta ventajas como son: no hay formación de cristales de hielo, mayor rapidez en el procesamiento y menor costo. Por ello, la vitrificación puede reemplazar a la congelación convencional, especialmente cuando se intenta conservar embriones sensibles a la criopreservación, como son los producidos in vitro (Seidel et al., 2012).

A finales de los años '90 el uso de vitrificación estaba limitada al uso de pajillas de 0.25ml y al tomar en contacto directo con el nitrógeno líquido lograba tasa de enfriamiento de 2500°C/min (Palasz y Mapletoft, 1996). Sin embargo, este volumen podría no distribuir uniformemente la temperatura, por ello se orientó al uso de nuevas técnicas con mínimo volumen como el Cryotop, con lo que se consiguen aún mayores velocidades de enfriamiento (42.100 °C/minuto) o sistema en el que los embriones se cargan en un volumen de 0,5µl/embrión y permite velocidades de enfriamiento de 40.000°C/minuto, ambos dispositivos permiten un almacenamiento cerrado (Díez, 2012).

El trabajo de investigación tiene por objetivo comparar la tasa de sobrevivencia de los blastocistos producidos in vitro y vitrificados en dos dispositivos vitri-tip y vitri-top)

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo realizado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva "Carlos Rodríguez Villegas" del Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Lima, Perú, y el procedimiento de producción de embriones in vitro fue realizado con protocolos y medios comerciales (Vitrogen®, Brasil).

Producción de embriones in vitro en bovinos

Recuperación de los ovocitos con complejo cúmulus oophorus (COCs). Los ovarios de matadero, fueron lavados 2 a 3 veces con solución fisiológica de 0,9% de NaCl a 35 °C y conservados en la misma solución. Los COCs fueron aspirados de los folículos entre 3 a 8 mm de tamaño con aguja 18G de 1 ½ pulgadas, y transferidos a una placa de 35x10 mm (Falcon® 1008) conteniendo medio H-199® (Vitrogen, Brasil), para clasificarlos a 40X.

Maduración in vitro. Los COCs de grado A y B (viables) fueron lavados en medio transporte H-199® y en medio de maduración MIV® (Vitrogen, Brasil) previamente incubados a 38.5°C y 5% CO₂ por 2 horas. Se colocaron 8 a 10 COCs por microgota (70 µl) de medio MIV® y cubierta con aceite mineral (Sigma M3516) en placas 35x 10 mm (Falcon ® 1008) y llevados a incubación (22 a 24 horas) a 38.5°C y 5% CO₂ y 90 % Hd.

Fecundación in vitro. Después de la maduración, los ovocitos fueron lavados en medio de fecundación FIV® (Vitrogen, Brasil) y colocados en grupos de 8 a 10 ovocitos en microgotas de 70 µl de medio FIV® y cubiertos con aceite mineral, previamente incubados a 38.5°C y 5% CO₂ por 2 horas, posteriormente se adiciono 4 a 5 µl de suspensión de espermatozoide seleccionados y capacitados en medio FIV®.

Cultivo in vitro. 18 horas post inseminación, se denudaron los ovocitos y se lavaron en medio CIV (Vitrogen®, Brasil) y transferidos a microgotas de medio CIV de 70 µl (8 a 10 ovocitos), cubiertas de aceite mineral, luego fueron incubadas a 38,5°C, 5% CO₂, >85% de humedad. A las 48 horas y al día 4 del cultivo se realizó la renovación del 50% de medio CIV®, para el día 6 de cultivo (día 7, de fecundación) se obtuvieron los embriones en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido.

Dispositivos de vitrificación

Los dispositivos de vitrificación que utilizamos en este experimento fueron elaborados en el laboratorio de biotecnología reproductiva, con materiales del mismo y fueron expuestos a luz ultravioleta para su esterilización, antes de usar y tenían las siguientes características:

- a) Vitri-tip, Se utilizaron capilares finos de vidrio de alta calidad Marienfeld®, aprobados para uso in vitro, los cuales fueron expuestos a llama de mechero de alcohol, esta fue estirada controladamente, afinando el diámetro hasta un diámetro de 0.2 mm (aprox) (ver Figura 1a, procedimiento de vitrificación).
- b) Vitri-top, Las puntas amarillas (Tips) de 100 a 200 µl de las micropipetas volumétricas, fueron preparadas, enlazando láminas delgadas de polietileno transparente de 1.5cm de largo x 0.1cm de ancho a la punta de estos tips (ver Figura 1, procedimiento de vitrificación).

Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro

Los embriones (blastocistos) de calidad excelente y buena fueron colocados en la solución V1 (Vitrogen® Brasil) a 36 ° por 8 minutos, luego transferidos a V2 (Vitrogen® Brasil) por 1 min (Protocolo similar empleado por Asgari, 2009), posteriormente los blastocistos fueron cargados al azar en solución menor a 0.5 µl., en dos grupos: (1) dispositivo Vitri-tip, por capilaridad; (2) Vitri-top, en una lámina de polietileno, y los embriones, finalmente fueron introducidos a pajillas de 0.5cc, y sumergidos en el nitrógeno líquido.

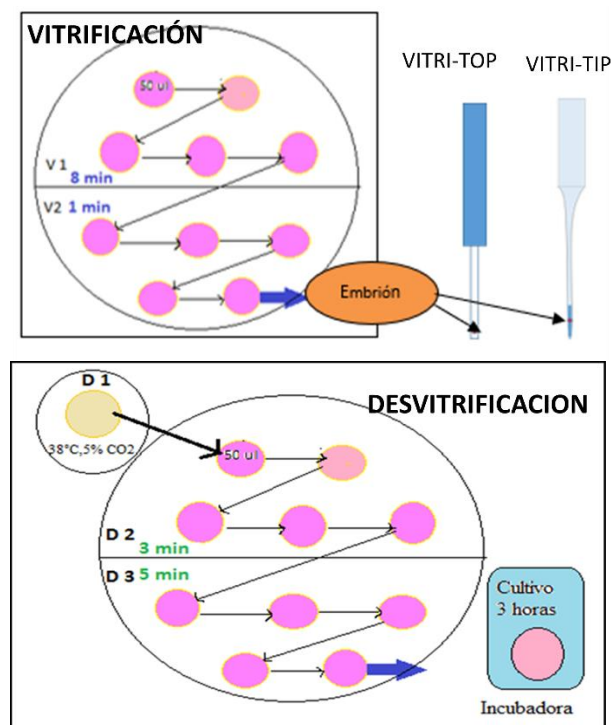


Figura 1. Procedimiento de vitrificación (superior) y desvitrificación (inferior).

Descongelación o desvitrificación

Se retiró la cubierta protectora exponiendo los blastocistos vitrificados a soluciones secuenciales de descongelación, en (D1) por 1 minuto a 38 °C con 5% CO₂, (D2) 3 min a temperatura ambiente, finalmente (D3) por 5 min y luego se llevó los embriones en gotas de medio de cultivo a la incubadora por 3 horas para evaluar sobrevivencia embrionaria por expansión del blastocisto y retorno a su tamaño original AbdelHafez et al. (2011), Desai et al. (2013) (ver figura 1).

Análisis estadístico

Los parámetros evaluados para ambos sistemas de vitrificación fueron las tasas de recuperación postdescongelamiento y la tasa de re-expansión in vitro a las 3 h de cultivo post descongelación. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de Chi- cuadrado, el índice de significancia fue establecido en $p < 0.05$

RESULTADOS Y DISCUSION

Para la ejecución del presente experimento, se realizaron 06 sesiones de producción de embriones in vitro, a partir de ovarios de camal, utilizando un total de 415 COC's, se produjeron 113 blastocistos (29% eficiencia).

Eficiencia del uso de dispositivos vitri-top y vitri-tip en vitrificación de embriones.

En el trabajo, se vitrificaron 100 blastocistos bovinos, siendo divididos 50 embriones en dispositivos vitri-tip y 50 embriones en dispositivos vitri-top, distribuidos al azar (Tabla 1).

Tabla 1. Tasas de recuperación de embriones vitrificados en dispositivos vitri-tip y vitri-top.

Dispositivo de vitrificación	Embriones en estado blastocisto	Tasa de recuperación, (%)
Vitri-tip	50	46 (92 %)a
Vitri-top	50	44 (88 %)a

Las comparaciones son en forma vertical, letras iguales significa que no existen diferencias significativas a,b ($p < 0.05$).

Los resultados de ambos tratamientos no demuestran gran variación en la tasa de pérdida embrionaria por manejo de bajo volumen. En los dispositivos Vitri-tip la tasa de recuperación fue 92 por ciento, similar al resultado obtenido con el uso de otro dispositivo de similar volumen como el cryotip®, reportados por AbdelHafez et al., (2011) y Banti, (2014) con una tasa de recuperación del 85 por ciento y 74.6 por ciento respectivamente. Nuestros resultados obtenidos en la tasa de recuperación con el dispositivo Vitri-top fue 88 por ciento, mostrándose ligeramente inferior con relación a otros dispositivos modernos también de mínimo volumen como cryoloop® con 100 por ciento de tasa de recuperación publicado por AbdelHafez et al., (2011), y con este mismo dispositivo Desai et al., (2013) logró un 99 por ciento. Asimismo, el Vitri-top fue inferior también comparado a dispositivo con mínimo volumen como el rapid-i® con la cual Desai et al., (2013) logró un 99 por ciento de recuperación y Banti, (2014) obtuvo con rapid-i® 97.1 por ciento.

Como se observa nuestra tasa de pérdida fue mínima, sin embargo, estas pérdidas, se debió probablemente a la dificultad en el manejo de volúmenes tan pequeños (0.5 µl), lo que permitió que los embriones se adhiran a la superficie del dispositivo y no se logre ubicar al momento de la descongelación. Sin embargo, estos dispositivos seguros, que evitaría cualquier riesgo de contaminación que comprometa la supervivencia y la tasa de desarrollo in vitro.

Sobrevivencia embrionaria por re-expansión a 3 horas post desvitrificación de los blastocistos bovinos producidos in vitro

La tasa de re-expansión (sobrevivencia) de blastocistos vitrificados no mostraron diferencias significativas entre ambos dispositivos ($p > 0.05$) (ver Tabla 2), indicando de esta manera que siempre existe un deterioro de los embriones como resultado del proceso de la vitrificación y descongelación, que podría comprometer su capacidad implantatoria en el útero de la receptora.

Tabla 2: Tasa de re-expansión a 3 h post descongelación blastocistos bovinos producidos in vitro.

Dispositivo de Vitrificación	Blastocistos cultivados (n)	Re-expandidos en cultivo <i>in vitro</i> a 3h, n (%)
Vitri-tip	46	24 (52) ^a
Vitri-top	44	21 (48) ^a

Las comparaciones son en forma vertical, letras iguales significa que no existen diferencias significativas a, b ($p < 0.5$).

Nuestros resultados con el protocolo de vitrificación aplicado difieren con resultados obtenidos por otros investigadores con dispositivos similares en volumen como; Desai et al., (2013) quienes reportan altas tasas de re-expansión a 2 h de cultivo en humanos con el dispositivo Rapid-i®, 99 por ciento y 96 por ciento con cryoloop®. Asimismo, nuestras tasas de sobrevivencia también fueron inferiores a los reportados de AbdelHafez et al., (2011) quienes obtuvieron una tasa re-expansión a 3 h en Cryoloop® 100 por ciento, HSV® 100 por ciento y cryotip® 79 por ciento.

Sin embargo nuestros resultados son comparables a los obtenidos por otros investigadores que han utilizado técnicas similares de vitrificación como Valbuena et al., (2012) quienes obtuvieron tasas de sobrevivencia de blastocistos humanos vitrificados a las 24 h post cultivo con cryotop® 22.78 por ciento y 53.77 por ciento con cryotip®, y también experimentaron con blastocistos de ratones obteniendo tasas de sobrevivencia de 38.46 por ciento con cryotop® y 85.41 por ciento con cryotip® y por último Banti (2014) igualmente reporta sobrevivencia en cryotip® 67.3 por ciento, mostrando con ello la variabilidad de los resultados en el proceso de la vitrificación.

La baja respuesta de sobrevivencia embrionaria post descongelación, pudo deberse a múltiples factores como son: la procedencia de los ovocitos de camal, selección de COCs, la calidad de los embriones utilizados, etapa de desarrollo, tipo de crioprotectores usados, parámetros de enfriamiento y calentamiento, la toxicidad de la solución, deshidratación celular, daño del hielo intracelular, fractura y shock osmótico, los tiempos de reposo en los medios de vitrificación, los materiales utilizados, la esterilidad del ambiente y la temperatura (He et al., 2008).

Otra desventaja posible fue criopreservar embriones producidos in vitro, y COCs procedentes de camal siendo estos más susceptibles a la criopreservación, comparado a los embriones producidos in vivo, podemos explicar este comportamiento relacionándolo con características embrionarias publicadas en (Pelaez, 2011 y Seidel, 2012) quienes indicaron que en los embriones producidos in vitro, hay menor densidad de blastómeros, mayor tendencia a la formación de hielo intracelular, mayor presencia de micro gotas citoplasmáticas de lípidos y proteínas, las cuales modifican las características de comportamiento físicas y funcionales tanto de las membranas de las blastómeros como de la zona pelúcida lo que los hace más sensibles al enfriamiento y a la invasión de virus, bacterias y hongos,

disminuyendo de esta forma las tasas de sobrevivencia de los embriones in vitro.

CONCLUSION

El uso de dispositivos preparados en el laboratorio es una buena alternativa para su empleo en vitrificación de embriones bovinos y conservación de germoplasma animal

CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

La concepción y diseño del estudio, o adquisición de datos, o análisis e interpretación de datos (MSE,CCR,QC,AE,DD), adquisición de fondos y administración de proyecto (MSE), redactar el artículo o revisarlo críticamente para contenido intelectual importante (MSE,CCR), aprobación definitiva de la versión a presentar (MSE).

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a las personas que dirigen el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y a los maestros de la Facultad Zootecnia – UNALM Mg. Sc Prospero Cabrera, Mg. Sc. Enrique Alvarado, Mg. Sc. Amalia Gallegos, M.V. Segundo Gamarra.

REFERENCIAS

- AbdelHafez XI, Goldberg J, Desai N. Vitrification in Open and Closed Carriers at Different Cell Stages: Assessment of Embryo Survival, Development, DNA Integrity and Stability during Vapor Phase Storage for Transport. Consultado Set. 2019. Disponible 2011. en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/29>
- Asgari B, Mohsen F, Morteza H, Hajian M, Moulavi F, Abedi P, Laleh L. Optimized Method for Bovine Blastocyst Vitrification Using a Simple Hand-Made Cryotip Yakhteh Medical Journal, 2009. 11:2.
- Banti M. Comparison of recovery, survival and clinical pregnancy rate between two different closed vitrification devices (Rapid-i/Cryotip). Embryology Department, London Fertility Centre. Disponible en: <http://www.lfc.org.uk/sites/default/files/upload/london-fertility-centre-scientificposter-ri-vs-cryotip-2014.pdf>. Consultado Jul 2019
- Díez C. Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción. 2012

- Desai N, Goldberg J, Austin C, Falcone T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2013, 11:41 p
- He X, Park E, Fowler A, Yarmush M, Toner M. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology*. 2008; 56, Supl. 3:223–232p.
- Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.* 1996; 14, 127–149p.
- Peláez P. Producción in vitro de Embriones. Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad de Cuenca. Ecuador. 2011. 74p
- Rall WE, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196° C by vitrification. *Nature*. 1985. 313:573-575.
- Seidel G, Jason K, Jason E, Bruemmer A. Vitrification of in vitro and in vivo produced bovine embryos for direct transfer. Tesis: Mag.Sc. Department of Biomedical Sciences Colorado State University. 2012. 82p. 58
- Valbuena D, Póo ME, Aguilar-Gallardo C, Martinez S, Cobo AC, Pellicer A, Simón C. Comparison of Cryotip vs. Cryotop for mouse and human blastomere vitrification. *Fertil Steril*. 2012; 97(1):209-17.