

# Vitrificación sobre desarrollo morfológico y expresión génica de ovocitos para producir embriones bovinos de razas tropicales

*López Rivero Arleth Susana<sup>1</sup>, Gómez Fontalvo Rachel Ivanna<sup>2</sup>*

## RESUMEN

Se realizó una revisión bibliográfica con el fin de analizar el reporte de los efectos moleculares y bioquímicos de la vitrificación, sobre el desarrollo morfológico y la expresión génica de ovocitos bovinos. Se utilizaron los motores de búsqueda Scopus y Pubmed para la selección de artículos de investigación y de revisión de revistas indexadas cuyas temáticas estuvieran relacionadas con la viabilidad (morfolología de núcleo y citoplasmas) de ovocitos bovinos y la expresión de los genes igf-egf. Los criterios de inclusión estuvieron basados especialmente en artículos que mostraron una descripción de los factores que afectan la viabilidad y la expresión génica. El análisis mostró que el estudio de los métodos de preservación de ovocitos es un tema atractivo entre países especialmente de América y Asia. Las técnicas de vitrificación y congelamiento de ovocitos bovinos han sido estudiadas desde 1991 siendo una de las más utilizada a lo largo de los años para ejercer una mejor producción bovina. Las técnicas de congelación y vitrificación son ampliamente utilizadas tanto en el campo de la investigación como en el área comercial para la producción de embriones de bovinos de manera in vitro, siendo ambas efectiva para la preservación de ovocitos. No se encontró reporte de alteraciones morfológicas irreversibles en la célula que estuviera asociada a la técnica de preservación utilizada.

**Palabras clave:** Vitrificación, desarrollo morfológico, expresión génica de ovocitos, embriones bovinos.

1. Profesora. Programa de Microbiología. Universidad Libre Barranquilla. [arleths.lopezr@unilibre.edu.co](mailto:arleths.lopezr@unilibre.edu.co)

2. Estudiante. Programa de Microbiología. Universidad Libre Barranquilla. [rachelli-gomezf@unilibre.edu.co](mailto:rachelli-gomezf@unilibre.edu.co)

# Vitrification on morphological development and gene expression of oocytes to produce bovine embryos of tropical breeds

## ABSTRACT

A literature review was carried out to analyze the report of the molecular and biochemical effects of vitrification on the morphological development and gene expression of bovine oocytes. The search engines Scopus and Pubmed were used for the selection of research and review articles from indexed journals whose topics were related to the viability (nucleus and cytoplasm morphology) of bovine oocytes and the expression of igf-egf genes. The inclusion criteria were based especially on articles that showed a description of the factors affecting viability and gene expression. The analysis showed that the study of oocyte preservation methods is an attractive topic among countries especially in America and Asia. The techniques of vitrification and freezing of bovine oocytes have been studied since 1991 being one of the most used over the years to exercise better bovine production. The freezing and vitrification techniques are widely used both in the research field and in the commercial area for the production of bovine embryos in vitro, being both effective for the preservation of oocytes. There were no reports of irreversible morphological alterations in the cell associated with the preservation technique used.

**Key words.** Vitrification, morphological development, oocyte gene expression, bovine embryos.

## INTRODUCCIÓN

La biología reproductiva aplicada a la actividad de ganadería ha generado impactos invaluable en el campo investigativo. Estos avances han contribuido con el desarrollo de tecnologías que, en los últimos años, han sido utilizadas con propósitos comerciales. En este contexto, se presenta una propuesta basada en el estudio de la producción in vitro de embriones bovinos, como herramienta de mejoramiento genético. La aplicación de principios biotecnológicos que conduzcan a la optimización de procesos que mejoren la eficiencia de la técnica in vitro<sup>1</sup>, permite la identificación y análisis de los fenómenos moleculares y bioquímicos ocurridos durante la maduración del ovocito, la capacitación espermática, la interacción de gametos y el desarrollo embrionario temprano, para lograr resultados de interés científico que sean traducidos en avances de interés económico al sector ganadero<sup>2</sup>

La técnica de vitrificación viene siendo utilizada como mecanismo de preservación de muestras biológicas, para la optimización de las prácticas de reproducción bovina con miras en el mejoramiento de razas<sup>3</sup>. Su importancia deriva de las limitaciones que muestra el congelamiento de embriones, proceso que ha sido utilizado tradicionalmente, para crio preservar embriones producidos in vivo y cuyos resultados muestran una calidad inferior de embriones y alteraciones de tipo fisiológico, bioquímico y/o molecular, que pueden influenciar la capacidad de desarrollo y la viabilidad de este<sup>4</sup>.

Bajo este concepto ha sido realizada esta revisión bibliográfica documental, con el objetivo de analizar los efectos moleculares y bioquímicos que han sido reportados en relación a la técnica de vitrificación como proceso alternativo de preservación de muestra ovocitaria para la producción in vitro de embriones. En primer lugar, se identificaron las diferencias en la morfología del núcleo de ovocitos bovinos congelados y vitrificados que mas han sido reportadas en la literatura, luego se describieron las diferencias en la morfología del citoplasma de ovocitos bovinos congelados y vitrificados para finalmente determinar si existe reporte de aumento o disminución de la expresión de los genes igf-egf en ovocitos vitrificados frente a ovocitos congelados.

## METODOLOGÍA

Este estudio corresponde a una investigación descriptiva de tipo documental<sup>5</sup> con enfoque cualitativo. El método de recolección de datos utilizados fue la revisión bibliográfica bajo el concepto de búsqueda y recopilación de información actualizada y relacionada con los objetivos propuestos en motores de búsqueda tales como Scopus, Pubmed entre otros. Los descriptores utilizados fueron: “Producción in vitro y embriones”, “Ovocitos bovinos y viabilidad”, “Expresión génica y ovocitos bovinos” y “Brahmán, Gyr, Romosinuano”. “In vitro production and embryos” Bovine oocytes and viability”, “Gene expression and bovine oocytes” and “Brahman, Gyr, Romosinuano”.

El tipo de análisis empleado corresponde a artículos relacionados con el estudio de ovocitos provenientes de biotipos bovinos puros y F1 de las razas Gyr, Brahmán y Romosiano. El análisis estuvo centrado en la viabilidad (morfología de núcleo y citoplasmas) y la expresión de los genes *igf-egf*.

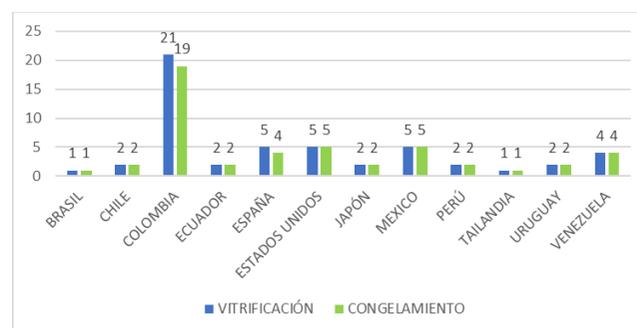
De acuerdo con este tipo de estudio y las fuentes de información utilizadas aplican términos y condiciones comunes al uso de todos los sitios web, aplicaciones, servicios y productos de Elsevier y el National Center for Biotechnology (NCBI). Se aclara que las políticas de privacidad establecen que la información obtenida a partir de estos recursos es de dominio público y puede ser copiada y distribuida libremente, siempre que obligatoriamente se brinde el reconocimiento respectivo a los autores y revistas consultadas, de acuerdo con los términos y condiciones establecidos por el titular de los derechos de autor.

## RESULTADOS

### Búsqueda y análisis de la información

La búsqueda proporcionó un número total de 350 artículos de los cuales, 200 se obtuvieron de la base de datos Scopus, 100 de Pubmed y 50 Science Direct, tal como se puede apreciar en la figura 1. El análisis de la afinidad de la temática con los objetivos de esta revisión permitió la construcción de una matriz de referencia de 57 artículos incluidos en este trabajo de acuerdo con la temática, ya sea de vitrificación o congelamiento.

A partir de la revisión se consideró que el estudio de los métodos de preservación de ovocitos es un tema atractivo entre países especialmente de América y Asia. El mayor número de publicaciones seleccionadas que describían técnicas de preservación fueron desarrolladas en Colombia. Estos resultados sugieren un interés creciente en la tecnificación de la actividad de ganadería en estos países<sup>6</sup>. Japón, Uruguay, Ecuador, Chile y Perú también muestran un menor número de publicaciones, aunque fueron seleccionadas aquellas cuya temática guarda relación con los objetivos de esta revisión. Lo cual se visualiza en la figura 1 presentada a continuación:



**Figura 1. Origen de publicaciones.** Distribución de las publicaciones encontradas por países y temáticas, ya sea de vitrificación o congelamiento

Lastécnicas devitrificación y congelamiento han sido estudiadas desde 1991. A partir de este año, se observa un comportamiento creciente de publicaciones que alcanza un número mayor de publicaciones desde el año 2002 hasta la actualidad. Es importante destacar que el mayor número de publicaciones fueron registradas entre

los años 2019 y 2020, aspecto que podría estar relacionado con el desarrollo de la biotecnología molecular<sup>7</sup>

### **Preservación de ovocitos bovinos: congelamiento vs. vitrificación**

La preservación de ovocitos ha sido implementada a lo largo de los años para encontrar las mejores condiciones que aseguren un mayor rendimiento en los procesos de maduración y viabilidad de las células. La bibliografía consultada mostró que la técnica de congelamiento es una buena práctica para la conservación de ovocitos<sup>8</sup>, generando un progreso genético rápido que impacta altamente la producción de leche o carne. Con esta técnica se ve un mejor manejo de la información genética y los daños a la expresión de los genes y núcleos no constantes<sup>9</sup>. En los últimos años, esta técnica es cada vez más utilizada con expectativa de aumentar los casos de éxito<sup>10</sup>.

La técnica de vitrificación por su parte, se refiere a un proceso físico de solidificación de una solución a bajas temperatura con la formación de cristales de hielo. Este fenómeno puede ser considerado como un incremento extremo de la viscosidad y requiere de altas tasas de enfriamiento y calentamiento<sup>11</sup>. Algunas características de esta es que hay contacto directo entre los embriones y el nitrógeno líquido, se utilizan altas concentraciones de crioprotectores y las tasas de enfriamiento son lo suficientemente rápidas para evitar

la pérdida del equilibrio osmótico y el daño celular<sup>12</sup>

### **Morfología del citoplasma de ovocitos bovinos congelados y vitrificados**

Los efectos biológicos asociados a la preservación de células a bajas temperaturas son complejos y todavía desconocidos en muchos aspectos. Durante el proceso de vitrificación/desvitrificación, los ovocitos y embriones se someten a diferentes condiciones que pueden llegar a afectar su integridad: exposición inicial a los agentes crioprotectores, enfriamiento a temperaturas bajo cero, almacenamiento, calentamiento y, finalmente, dilución y eliminación de los agentes crioprotectores con retorno a un ambiente fisiológico<sup>13</sup>

### **Genes igf-egf en ovocitos vitrificados y congelados**

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) es un polipéptido sintetizado en órganos de importancia reproductiva como el hipotálamo, ovario, oviducto y el útero, además de la placenta, el corazón, el pulmón, el riñón, el hígado, entre otros<sup>14</sup>. El IGF-I endocrino se asocia con varias características reproductivas, tales como la edad al primer parto, la tasa de concepción y concepción al primer servicio. La principal aplicación es la posible utilidad de la concentración de IGF-I como un factor de predicción del éxito reproductivo<sup>15</sup>. Por otra parte, el EGF es una molécula de 53 aminoácidos con un PM de 6 KDa, que en un

tiempo se llamó urogastrona. La homología entre el EGF y el TGF $\alpha$  es de un 55%, y sus acciones biológicas son semejantes, ya que se unen al mismo receptor<sup>16</sup>

## DISCUSIÓN

Los reportes bibliográficos incluidos en este estudio mostraron que, según su principio, la técnica de vitrificación requiere un periodo de tiempo menor para lograr el congelamiento de la célula sin que exista lugar para la formación de cristales. Zarate<sup>17</sup> a partir de sus estudios comparativos entre vitrificación y congelamiento concluyó que la morfología de ovocitos evoluciona correctamente hasta alcanzar su estado de maduración utilizando la técnica de vitrificación. Aunque la técnica de congelación también permite obtener ovocitos viables, el rendimiento y la calidad morfológica son mayores en ovocitos maduros que fueron preservados mediante la técnica de vitrificación.

Respecto a los efectos moleculares y bioquímicos de la técnica estudiada se encontró que son pocos los reportes de efectos negativos sobre ovocitos cuando el método de preservación utilizado es el congelamiento<sup>18</sup>. Estudios experimentales de Landin<sup>19</sup> en los cuales se evalúa el efecto de la vitrificación en la calidad y madurez de los ovocitos bovinos, mostraron que a partir de un total de 114 ovocitos, 50 estaban ubicados en una categoría I de mayor calidad, 37 en categoría II de calidad intermedia y 27 en categoría III

de baja calidad. Los tres tipos de muestra no presentaron alteraciones que pudieran relacionarse con el método de preservación utilizado.

Otros estudios mostraron el procedimiento de evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos de vacas mestizas *B. taurus* y *B. indicus*. Los ovocitos fueron recuperados de ovarios de hembras bovinas provenientes de un matadero comercial. Para la obtención de los complejos cumulus-ovocitos (CCO) se realizó la técnica de Slicing, seleccionando los ovocitos que tenían al menos una capa de células del cumulus y un citoplasma homogéneo. Los resultados de este estudio demostraron que el ganado con predominancia fenotípica *B. indicus* presentaba mejores tasas de maduración y fecundación in vitro que el ganado predominantemente *B. taurus*, debido a que sus ovocitos son más competentes con genes termotolerantes, capaces de resistir las condiciones ambientales del trópico y que pueden llegar a desarrollarse en mayor porcentaje que el ganado *B. taurus*<sup>20</sup>.

Silva<sup>21</sup> evaluó la tasa de maduración in vitro post descongelación de ovocitos bovinos, de la raza Frisón Rojo Chileno, parcialmente madurados y vitrificados. En este caso a pesar de la reducción en la tasa de maduración nuclear en comparación a los ovocitos control, la vitrificación de ovocitos parcialmente madurados es una alternativa efectiva para la conservación de material genético proveniente de hembras

bovinas de la raza Frisón Rojo Chileno. Peláez<sup>22</sup> resalta la calidad y confiabilidad de ambas técnicas en la producción animal, aspecto reafirmado por Sánchez<sup>23</sup> quien considera que la transferencia de embriones in vitro es una técnica de alto valor científico debido a que impacta directamente los índices reproductivos y productivos, mejorando su clasificación genética y obteniendo mucho más rápido estudios de progenie de sus ejemplares.

## CONCLUSIONES

Los modelos económicos tan fuertes como la actividad de ganadería, requiere un constante fortalecimiento en tecnología e innovación para mantener su importancia dentro de las cifras de producción. En este sentido, el diseño de propuestas potencialmente eficaces requiere de un análisis detallado de todos los aspectos que influyen en el éxito de la tecnología aplicada. Aunque son muchos los avances generados hasta el momento en la producción de embriones bovinos de manera in vitro, las tasas de rendimiento y porcentajes de éxito revelan la necesidad de optimizar los procesos para lograr mejores resultados.

La construcción de este referente bibliográfico para la aplicación de técnicas de preservación tales como la congelación y la vitrificación permitió establecer principalmente que, en Colombia existen grupos de investigación dedicados a optimizar el proceso de cultivo in vitro de embriones, analizando las técnicas

de preservación y sus efectos sobre las células sexuales y embriones de bovinos. De ahí que, las técnicas de congelación y vitrificación son ampliamente utilizadas tanto en el campo de la investigación como en el área comercial para la producción de embriones de bovinos de manera in vitro.

A su vez, existen estudios experimentales que sustentan una mayor eficiencia de la técnica vitrificación para la preservación de ovocitos en estadio maduro mientras que, en contraste también hay estudios experimentales que revelan que la técnica de congelamiento lenta, permite la utilización de ovocitos en técnicas de fertilización sin que se afecte su viabilidad<sup>24</sup>

De cierta forma, tanto la técnica de congelamiento como la de vitrificación constituyen una buena alternativa de preservación de ovocitos. Su principal diferencia está en el estadio del ovocito para el cual es más óptima cada una. De esta forma, el congelamiento puede ser utilizado en cualquier estadio logrando buenos resultados, mientras que la técnica de vitrificación ofrece los mejores resultados en ovocitos maduros.

De acuerdo a la bibliografía consultada, las técnicas de preservación analizadas en este trabajo no producen alteraciones morfológicas irreversibles en la célula. Estudios experimentales muestran un alto porcentaje de recuperación morfológica posterior a la aplicación de la técnica de preservación. Sin embargo, no existen

reportes suficientes, que describan un impacto de las técnicas de preservación analizadas en este estudio sobre la expresión génica en ovocitos y embriones de bovinos.

Por todo lo anterior se recomienda el planteamiento de estudios experimentales que permitan complementar la bibliografía que soporta la importancia de las técnicas de preservación en el proceso de producción de embriones in vitro. El principal desafío, es la determinación de perfiles de expresión génica que puedan ser caracterizados y utilizados en el aumento del porcentaje de éxito de la tecnología completa de fertilización in vitro y transferencia embrionaria en bovinos de razas de alta producción.

## Referencias bibliográficas

1. Ávila LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, et al. Fundamentos de crío preservación. Colombia. 2016
2. Barbeito CG, Andres, PF. Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. Analecta Veterinaria, 2005.
3. Báez FJ, Chávez AC, Hernández H, Villamedina P. Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica bos taurus y bos indicus. 2010, 20 (3):259-267 [online]. [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592010000300007](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300007)
4. Buendía P. Efecto de la vitrificación en la incidencia de aneuploidías en los resultados clínicos del Programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional. Tesis de doctorado. Valencia: Universidad de Valencia, 2015.
5. Cardona A. Las cinco mejores razas carne y leche miércoles, 2017 Editorial Colombia
6. Coello ÁM. Efecto de la vitrificación de ovocitos y embriones en el desarrollo embrionario y resultados clínicos: análisis morfocinético mediante la tecnología time-lapse. Trabajo de grado. 2019. [internet]. disponible en: <https://roderic.uv.es/handle/10550/707777>
7. De Moraes MEB, Adona PR, Guembra, S, De Bem THC, Dos Santos M. Effect of single dose follicle stimulating hormone on follicular aspiration, in vitro fertilization and pregnancy rate. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2019. 56:e156894-e156894.
8. Espinoza S. efecto de la vitrificación sobre la viabilidad y maduración de ovocitos bovinos criollos. Universidad Nacional de San Cristóbal 2019.
9. Francisco J, Báez A, Pirela PJ, Landinez A, Villamedina P. Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad de ovocitos bovinos madurados in vitro. Venezuela. 2009.
10. Galván P. Mejoramiento genético del ganado bovino producto de leche. departamento de genética y bioestadística Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica UNAMC. 1991, México.
11. Giraldo J. Efecto del crío protector dimetilformamida sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro Colombia. 2011

12. Izquierdo A. congelación de embriones bovinos. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 2015 9(2):22-40
13. Palma G. Producción in vitro de embriones bovinos. 2018
14. Peláez V. Producción in vitro de embriones bovinos. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2011.
15. Ramírez J. Formación en producción in vitro de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia, 2020.
16. Ruiz JL, Uribe L, Osorio JH. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina, 2011.
17. Sánchez J. Transferencia de embriones bovinos in vitro. 2018 [internet]. disponible en <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/6109>
18. Shabrine S, Daftari A. IGF-1 en el cerebro como regulador de la función neuroendocrina reproductiva, 2005.
19. Serrano C. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos in vitro. Rev. Col. Cie. Pec. 2002, 15(3):286-292
20. Silva M, Calderón N. Vitricación de ovocitos bovinos parcialmente madurados de la raza Frisón Rojo Chileno. Int. J. Morphol .2016.
21. Somfai T, Hirao Y. Vitricación de ovocitos bovinos inmaduros en medios libres de proteínas: el impacto del protocolo de tratamiento con crio protectores, el medio base y el almacenamiento de ovarios. Japón. 2021
22. Urrego R. Epigenetic disorders and altered in gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. Epigenetics, 2014, 9: 803-815.
23. Zarate O. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovino. Universidad de Veracruzana 2006
24. Zulay N. Investigación: descriptiva, documental y experimental, 2017