

EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE LOS ÁCIDOS LINOLEICO Y OLEICO EN OOCITOS DE BOVINO

Comparative evaluation of the cryoprotective effect of linoleic and oleic acids on bovine oocytes

MM García-Rodríguez, I Gallegos-Morales, J Vargas-Mancilla, JC Díaz-Zagoya ✉

(MMGR)(IGM) División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
(JVM) Hospital de Gineco-Pediatría No. 48, Centro Médico Nacional del Bajío, Instituto Mexicano del Seguro Social
(JCDZ) Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Coyoacán, D.F. 04510, México. zagoya@servidor.unam.mx

Nota recibido: 08 de octubre de 2008, **aceptado:** 17 de diciembre de 2010

RESUMEN. Se estudió, utilizando microscopía estereoscópica o electrónica, el efecto crioprotector de los ácidos grasos linoleico y oleico en oocitos de bovino, comparativamente con glicerol. La baja temperatura (-196 °C) dañó todos los oocitos en los que se empleó oleico, 25 % en los que se utilizó linoleico y 15 % cuando se protegió con glicerol. La microscopía estereoscópica no evaluó el daño adecuadamente, en cambio la micrografía electrónica definió con certeza el grado del mismo.

Palabras clave: Oocitos, criopreservación, ácido linoleico, ácido oleico, glicerol.

ABSTRACT. The cryoprotective effect of linoleic and oleic acids on bovine oocytes, comparatively with glycerol, was studied using stereoscopic and electronic microscopy. The low temperature (-196°C) damaged all the oocytes treated with oleic acid, 25 % of those treated with linoleic acid and 15 % when they were protected with glycerol. The damage was not detected adequately by stereoscopic microscopy, however it was clearly defined using electronic microscopy.

Key words: Oocytes, cryopreservation, linoleic acid, oleic acid, glycerol.

INTRODUCCIÓN

En la reproducción de bovinos se ha empleado la congelación de oocitos para la preservación de éstos. La criopreservación busca el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular. Esta técnica se ha utilizado en la preservación de células aisladas empleando glicerol (Smith AV, Polge C 1950. *Nature* 166: 668-669), existiendo dificultades para su empleo, así como toxicidad inherente a los criopreservadores. En la criopreservación de los oocitos además de buscar el mantener la viabilidad celular, es básico preservar su capacidad para la fecundación y el desarrollo embrionario. Este procedimiento también ha permitido conservar la capacidad fecundante del semen por períodos prolongados (Smith AV, Polge C, Smiles J 1951. *JR Microscop Soc* 71: 186-195). Con la introducción de la producción in vitro de embriones de bovino, emergió la demanda

rutinaria de oocitos (Barnes F, Endebrock M, Looney C, Powell R, Westhusin M, Bondili K 1993, *J Reprod Fertil* 97: 317-320), y la necesidad de almacenar oocitos maduros a temperaturas subcero (Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO 2000, *Theriogenology* 53: 59-72).

Los crioprotectores mayormente utilizados son glicerol, dimetilsulfóxido, etilén-glicol y 1,2-propanodiol, distintos azúcares como glucosa, trehalosa, sacarosa y fructosa, entre otros. El glicerol es el crioprotector mayormente utilizado, habiéndose combinado diferentes crioprotectores químicos tanto en oocitos como de embriones, con variaciones en la concentración, tiempo de incubación, así como otras condiciones como el volumen y la presión; todas estas estrategias buscando evitar la formación de cristales de hielo (Vajta G, Kuwayama M 2006, *Theriogenology* 65: 236-244; Saenz J, El-Moussaoui K, Calvillo JA, Campa R, Risco R 2001, *Cryobiology*

43: 375, Abstract 139), lo cual resulta esencial para mantener la viabilidad celular, evitando o minimizando el daño.

En el presente trabajo se planeó la utilización de los ácidos linoleico u oleico como crioprotectores. El ácido linoleico se ha utilizado en embriones de bovino con resultados favorables (Imai K, Kobayashi S, Goto Y, Dochi O, Shimohira I 1997, Theriogenology 47: 347), es el ácido insaturado más abundante en el fluido folicular (Zeron Y, Sklan D, Arav A 2002, Mol Reprod Dev 61: 271-278) y en las membranas celulares de oocitos de cabras, bovinos y cerdos (22 a 26 %) y en los oocitos de humanos (9.8 %). El ácido oleico es el segundo en abundancia en los oocitos de humanos. Hasta hoy no se han realizado investigaciones utilizando este ácido como crioprotector. Por lo tanto se utilizaron estos dos ácidos como crioprotectores, buscando conservar la integridad celular y molecular de los oocitos sometidos a temperaturas subcero (-196 °C).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 68 ovarios de bovino, los cuales se trasladaron en solución salina al 0.9 %, al laboratorio. La obtención de los oocitos se realizó mediante la técnica de punción folicular con jeringas de insulina con agujas calibre 18 g. Se puncionaron los folículos con diámetro mayor a 0.5 mm; el licor folicular extraído se colocó en una caja de petri de 5 cm de diámetro y fue observado bajo microscopía estereoscópica (Carl Zeiss 475822, Alemania). Una vez identificados los oocitos éstos fueron capturados con una jeringa de insulina adaptada a una micropipeta (Becton Dickinson No. 365878). Se seleccionaron los oocitos que presentaban características morfológicas idóneas de calidad uno (Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I 1994, Mol Reprod Dev 37: 38-53); se lavaron en tres ocasiones consecutivas con solución de Fosfato Buffer Salina (PBS) 136.8 mM (Wilde O, Literat B, Vega A, Cautelan M, Cruz ML 1984, Rev Agron NO Arg 22: 63-66).

Para la criopreservación se utilizó medio de cultivo Dulbecco (Bovi Pro-minitube), albúmina al 5 % (Sigma A-4503), con 0.25 mg ml⁻¹ de ácido

linoleico (Sigma L-1376-15) o ácido oleico (Sigma O-9500). El medio se esterilizó mediante filtración en millipore acrodisc (Pall-Life Sciences) previo al empajillado de los oocitos.

La pajilla se llenó por el método de aspiración (Rall WF 1995, Cryobiology 24: 387-402). Primero se aspiró medio crioprotector, luego aire, en seguida medio con los oocitos, luego más aire y finalmente medio crioprotector. Los extremos de la pajilla fueron sellados con una pinza hemostática calentada. Se acondicionaron cinco oocitos en cada pajilla de 0.25 mm de diámetro interior, utilizando cuatro pajillas para cada tratamiento.

Las pajillas se mantuvieron 5 min a temperatura ambiente antes de colocarlas en un pozo frío (cilindro de vidrio, conteniendo alcohol etílico a -7 °C, el cual se colocó en nitrógeno líquido durante 10 min, induciendo la nucleación del hielo y dejando las pajillas durante 5 min a esta temperatura. Posteriormente, se inició el descenso de la temperatura a razón de 0.5 °C por minuto hasta alcanzar -37 °C, con un congelador programable; luego las pajillas fueron sacadas del pozo frío y sumergidas rápidamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -196 °C hasta el momento de su descongelación. La descongelación se realizó después de una a cuatro semanas. Las pajillas se colocaron en un descongelador automático (Agsouce Genex-Livestock) durante 20 s a 37 °C.

La remoción del crioprotector de los oocitos mantenidos en glicerol se realizó aplicando la técnica de Ake (Ake R, Centurión F, Alfaro M 1994, Notas Pedagógicas. Universidad Autónoma de Yucatán, pp 183). Los oocitos criopreservados con ácidos grasos se transfirieron directamente a la caja de petri conteniendo el mismo medio de congelación. Se procesaron por cualquiera de las siguientes técnicas para su valoración morfológica: tinción de Giemsa, tinción de azul de toluidina y fijación para microscopía electrónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación de la calidad

Se puncionaron 347 folículos, de los cuales se pudieron recuperar un total de 319 oocitos, 212 de

calidad uno (66 %). En estos oocitos (Figura 1), la zona pelúcida se observa íntegra y bien definida, sin ninguna anomalía, con el ovoplasma homogéneo; también se pueden apreciar numerosas granulaciones acidofílicas en el material nuclear, indicadas por la cromatina teñida de color rojo; así también los cromosomas son visibles en el ovoplasma del oocito, como fibras muy largas de nucleoproteínas que forman la cromatina como se muestra en el corte del oocito teñido con azul de toluidina, observado bajo microscopía de contraste de fases. Otra de las estructuras observadas en el ovoplasma de estos oocitos es el centriolo, estructura compleja en forma de barril rodeado por material pericentriolar, electrónicamente denso, observándose claramente los rayos radiales, (Figura 2).

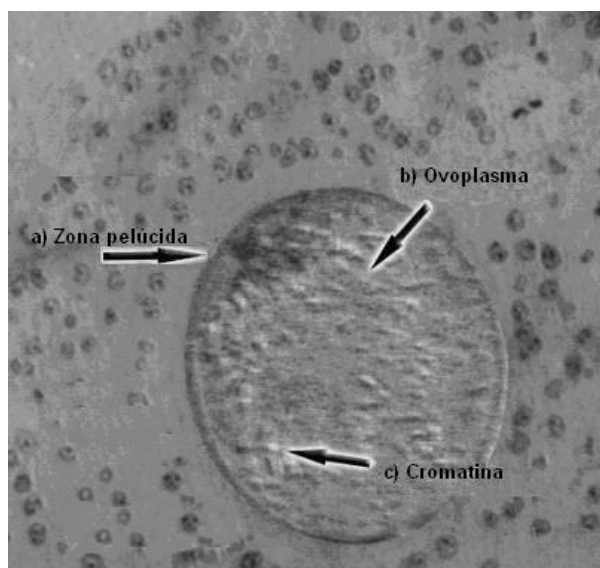


Figura 1. Oocito calidad uno, teñido con azul de toluidina observado con microscopio de contraste de fase. Aumento 60X; a) Zona pelúcida, b) Ovoplasma, c) Cromatina.

Figure 1. Quality one oocyte, dyed with toluidine blue and observed through phase-contrast microscopy. Magnification 60X; a) Pellucid zone, b) Ovoplasm, c) Chromatin.

Oocitos criopreservados en glicerol

En los 20 oocitos criopreservados en glicerol, se encontró que el 85 % presentó daño ligero como pérdida de células del *Cumulus oophorus*, y el 15 % sufrió un daño significativo: pérdida total de las células del *Cumulus oophorus* y ovoplasma degenerado, probablemente por la formación de cristales

de hielo, provocando la expansión, colapso y ruptura de la zona pelúcida y la pérdida completa de las células del *Cumulus oophorus*.

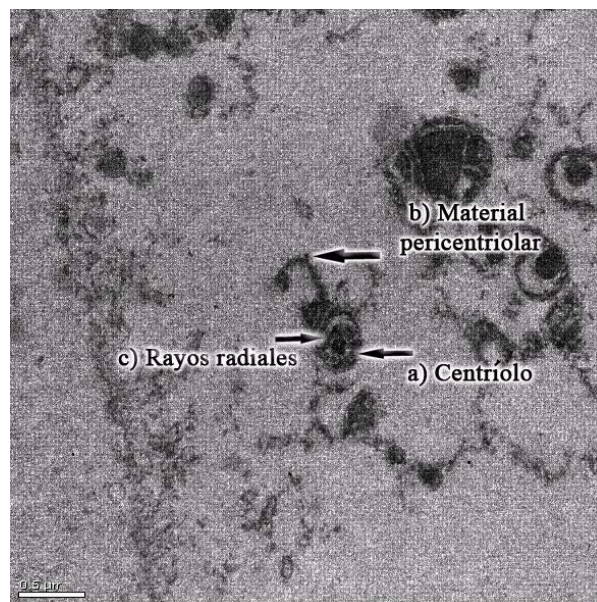


Figura 2. Ovoplasma de un oocito de calidad uno. Observación con microscopio electrónico de transmisión. Aumento 30KX; la barra representa 0.5×10^{-6} m; a) Centriolo, b) Material pericentriolar, c) Rayos radiales.

Figure 2. Ovoplasm of a quality one oocyte, observed through transmission electronic microscopy. Magnification 30 KX; the bar represents 0.5×10^{-6} m; a) Centriole, b) Pericentriolar material, c) Radial rays.

Oocitos criopreservados en ácido linoleico

De los 20 oocitos sometidos a temperaturas subcero en ácido linoleico como crioprotector, se encontró por microscopía estereoscópica, que el 75 % tenía las células del *Cumulus oophorus* completas con ligero aspecto plumoso, zona pelúcida intacta y ovoplasma homogéneo. El 25 % presentó las células del *Cumulus oophorus* incompletas y expandidas, con rupturas, la zona pelúcida intacta, y el ovoplasma homogéneo. Al observar con microscopía electrónica, las células del *Cumulus* muestran daño asociado a la formación de cristales de hielo, con distintos grados de desagregación celular; no se observa la membrana nuclear, en la matriz citoplasmática no hay integridad de los sistemas membranosos y la membrana celular se encuentra colapsada, (Figura 3A). Se observa la zona pelúcida íntegra, sin embargo se puede ver que la matriz citoplasmá-

tica del oocito, ha perdido su perfil característico, observándose espacios entre la zona pelúcida y el ovoplasma, siendo probable que estos espacios estuvieron ocupados por cristales de hielo. Se observa que se formaron también vesículas membranosas esféricas por la fragmentación de diferentes organelos (Figura 3B).

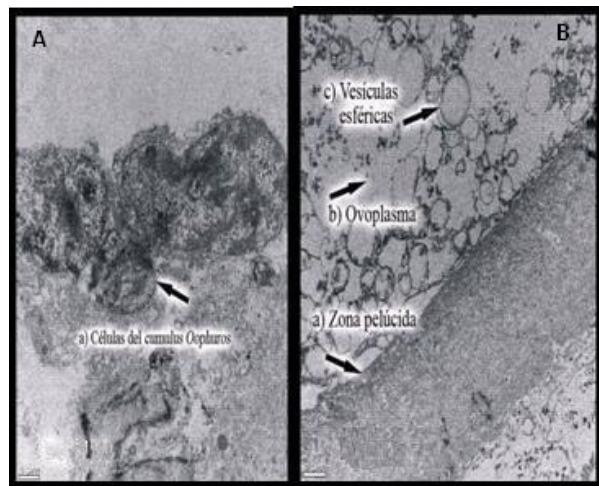


Figura 3. Oocito criopreservado en ácido linoleico. Observación con microscopio electrónico de transmisión. Aumento 10 KX; la barra representa 1×10^{-6} m. Se presenta extenso daño por el proceso de conservación. 3A: a) Células del *Cumulus Oophorus*. 3B: a) Zona pelúcida, b) Ovoplasma, c) Vesículas esféricas.

Figure 3. Oocyte cryopreserved in linoleic acid, observed through transmission electronic microscopy. Magnification 10 KX; the bar represents 1×10^{-6} m. Extensive damage is present due to the preservation process. 3A: a) *Cumulus oophorus* cells. 3B: a) Pellucid zone, b) Cytoplasm, c) Spherical vesicles.

Oocitos criopreservados en ácido oleico

De los 20 oocitos sometidos a temperaturas subcero en ácido oleico como crioprotector y observados bajo microscopía estereoscópica, el 100 % de las células presentó daño, con lisis completa de los cuerpos celulares.

Del total de los oocitos obtenidos 66 % fueron de calidad uno y el 34 % de calidad dos. El porcentaje de oocitos de buena calidad es semejante al obtenido por Cancino (Cancino AGR 2003, Tesis de Maestría, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, pp 78), e indica que el material obtenido era adecuado para ser sometido a temperaturas subcero. En cuanto a la integridad de organelos como mitocondrias, aparato de Golgi, centriolo, y matriz

citoplasmática, es evidente su normalidad en oocitos de calidad uno. El 75 % de los oocitos tratados con ácido linoleico presentó integridad celular semejante a la que tenían antes de ser congelados, con un aspecto ligeramente plumoso en las células del *Cumulus oophorus* como se pudo observar con la tinción de Giemsa. En la tinción con azul de toluidina no se observó integridad de la membrana celular en las células del *Cumulus oophorus*, pero los núcleos conservan su ultraestructura después de la descongelación. En el 25 % restante el daño es extenso, no compatible con los procesos vitales. Cuando se hizo la observación por microscopía electrónica, se encontró daño severo en la infraestructura celular: las mitocondrias no tienen su perfil característico y se ven edematizadas, con ruptura de sus membranas, con desagregación de la matriz citoplasmática, lo que origina la formación de múltiples vesículas esféricas. Estos daños coinciden con lo descrito por otros investigadores (Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodríguez A, Fernández L, De la Varga S, Fernández A, Facal N, Carbajo M 2005, *Theriogenology* 64: 317-333).

En el grupo control sólo 15 % de los oocitos sufrió daño severo, con pérdida total de las células del *Cumulus oophorus*, además, se aprecia la zona pelúcida ovalada. Daños similares han sido descritos por Marina, et al. (Marina S, Marina F, Torres PJ, Fosas N, Martin P, Alcolea R, Fernández S, Arnendó M, Jove I, Hochman M, Suñol J 2000, *Rev Iberoam Fertil* 19: 59-68), quienes reportan que los oocitos foliculares sometidos a congelación presentan cambios debidos a la mayor dureza de la zona pelúcida lo que reduce la tasa de fertilización. Por otro lado Veeck (Veeck LL 1999, *An atlas of human gametes and conceptuses*. Parthenon Pub, New York, pp 1-215) y Serhal et al. (Serhal PF, Raniere DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM 1997, *Hum Reprod* 12: 1267-1270) encontraron que cuando existe desagregación en el ovoplasma, hay presencia de múltiples cuerpos refráctiles, como los que se observaron en este grupo control. Estos investigadores reportaron esta anomalía como sáculos en el retículo endoplásmico liso que contienen material lipídico y gránulos densos. Hochi et al. (Hochi S, Kimura K, Hanada A 1999, *Theriogenology* 52:

497-504) mencionan que el ácido linoleico utilizado en el medio de cultivo para el desarrollo embrionario de las mórulas de bovino causa un efecto de tolerancia relativa a la congelación y explican que esto puede deberse a un incremento de la fluidez de la membrana celular. El ácido linoleico facilitaría el acceso de otras biomoléculas como el colesterol (Ehrenwald E, Foote R, Park J 1990, Mol Reprod Dev 25: 195-204). Lo anteriormente señalado apoya la posibilidad de utilizar el ácido linoleico como un crioprotector. Por otro lado, los resultados con ácido oleico no son favorables ya que todos los oocitos sometidos a temperaturas subcero mostraron daño en las células del *Cumulus oophorus*, zona pelúcida, y en el ovoplasma, evidenciando una alteración extensa incompatible con los procesos vitales que se pretende conservar.

Meryman (Meryman HT 1971, Cryobiology 8: 489-500) propone que la congelación no es más que la remoción de agua pura de una solución y su aislamiento en forma de cristales de hielo; con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo es importante mencionar que las células del *Cumulus oophorus* dañadas presentaron diferentes grados de desagregación, habiendo edema y ruptura de la membrana mitocondrial, zona pelúcida colapsada y expandida, lo que refleja no solo el impacto biológico, sino también efectos biofísicos, los cuales pueden deberse a cambios en la presión hidrostática de las soluciones utilizadas, (Liebermann J, Nawroth F, Isachenko U, Rahimi G, Tucker MJ 2002, Biol Reprod 67: 1671-1680).

En futuras investigaciones es conveniente in-

cluir otros lípidos como el ácido araquidónico y el colesterol (Moore AI, Squires EL, Gram JK 2005, Cryobiology 51: 241-249), ya que el araquidonato tiene un punto crioscópico más bajo que los ácidos grasos utilizados en la presente investigación. También es pertinente probar otras moléculas de naturaleza proteica, como las llamadas proteínas anticongelantes, en vista de que éstas evitan la formación de cristales de hielo disminuyendo el daño celular.

Los oocitos tratados tanto con ácido linoleico como con ácido oleico, presentaron un daño mayor que los criopreservados con glicerol, los que mostraron una mejor integridad morfológica. El 25 % de los oocitos tratados con ácido linoleico mostró daños severos en las células del *Cumulus oophorus*, incompatibles con los procesos vitales y el 100 % de los oocitos criopreservados con ácido oleico sufrieron daño severo como para ser utilizados en biología de la reproducción. De los dos ácidos grasos probados, el linoleico es el que mostró mejor efecto crioprotector aunque con desventaja con respecto al glicerol.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado en parte a través del PAPIIT IN223906. Se presentó en la XXXI Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR) en Acapulco, Gro. La microscopía electrónica se realizó en el Instituto de Neurobiología de la UNAM en Juriquilla, Qro., con la valiosa ayuda de la ingeniera bioquímica Lourdes Palma y el doctor Alfonso Cárabez.