

Microscopia confocal del huso meiótico de óvulos humanos y su tiempo de recuperación después de la vitrificación

Sandra Cubillos García,* Felipe Caldiño Soto,* Jeimy Pedraza Cepeda,* Silvio Cuneo Pareto*

RESUMEN

Antecedentes: en la actualidad se conoce poco el efecto de las técnicas de vitrificación en el huso meiótico del ovocito y su tiempo de recuperación en términos de funcionalidad posdesvitrificación.

Objetivo: evaluar el ensamble del huso meiótico y el alineamiento de los cromosomas en la placa metafásica en ovocitos humanos posdesvitrificación.

Material y método: 36 ovocitos en metafase II se vitrificaron usando 7.5% de etilenglicol, 7.5% de propanediol y 0.5 mol/L de sucrosa y el método del cryotop. El ensamble del huso meiótico se vigiló con microscopia confocal de la hora 0 a la hora 3 después de descongelar los ovocitos. Así, seis ovocitos fueron fijados a las cero horas, 12 a la hora, 12 a las dos horas y seis a las tres horas. Como control se fijaron seis ovocitos en metafase II sin vitrificar. Para la inmunohistoquímica los ovocitos se incubaron con un anticuerpo antitubulina y Alexa Fluor 488 y se analizaron por microscopia confocal, y se aplicó la U de Mann-Whitney. El significado se definió como $p < 0.05$.

Resultados: después de descongelar los ovocitos se observó una importante reducción de éstos con huso meiótico bipolar: inmediatamente al descongelar (T0): 66.7%, después de una hora de cultivo (T1): 91.6%, después de 1.5 horas (T2): 75%, y después de dos horas (T3): 67%. Una hora después de descongelar los ovocitos, la tubulina se polimerizó poco a poco, formando husos meióticos morfológicamente normales y con un alineamiento adecuado de los cromosomas. Una hora después de descongelar los ovocitos, la mayor parte recuperó su bipolaridad.

Conclusiones: sugerimos realizar la ICSI una hora después de desvitrificar los ovocitos. Debido a que ésta es una muestra muy pequeña y con un protocolo específico (PROH+EG), se sugiere realizar más estudios para confirmar estos resultados.

Palabras clave: huso meiótico, microscopia confocal, vitrificación ocular.

ABSTRACT

Background: Nowadays, little is known about the effect of vitrification method on spindle and its recovery time in terms of functionality.

Objective: To evaluate the process of meiotic spindle reassembly and chromosomal alignment of metaphase II in vitrified human oocyte. We monitored the time course and chromosome-MT (microtubule) characteristics of human meiotic spindles from zero to three hours after thawing using confocal microscopy.

Material and method: Oocytes were vitrified with the Cryotop method, 36 oocytes were vitrified with 7.5% ethylene glycol, 7.5% propanediol, and 0.5 mol/L sucrose. After thawing, six oocytes were fixed to zero hours, 12 at one hour, 12 at two hours and six at three hours. As control four extra unfrozen oocytes were compared with frozen oocyte fixed at 0, 1, 2 and 3 hours after thawing. For immunostaining of microtubules, oocytes were first incubated with mouse monoclonal anti tubulin followed by Alexa 488-labeled goat antimouse IgG. Oocytes were analyzed by confocal imaging system. Mann-Whitney U-tests were carried out. Significance was defined as $p < 0.05$.

Results: We analyzed 36 oocytes. Unfrozen control oocytes (100%) displayed bipolar spindles. After thawing there was a significant reduction of oocyte with bipolar spindle: (T0) 66.7%, after 1 h of culture (T1): 91.6%, after 1.5 h (T2): 75%, and after 2 h (T3): 67%. One hour following thawing, most oocytes recovered spindle bipolarity and equatorial chromosomal alignment. After warming of vitrified metaphase II oocytes, tubulin was depolymerized and chromatin remained condensed on the metaphase plate. Within a 1-hour period, tubulin repolymerized, forming morphologically normal metaphase spindles with properly aligned chromatin.

Conclusions: We found that the mean time of recovery of the spindle of thawed human oocytes after vitrification was one hour. For that reason we suggest to perform ICSI procedures after one hour of thawing. More studies should be done to confirm these results in this specific protocol.

Key words: meiotic spindle, confocal microscopy, oocyte vitrification.

* Concibe Reproducción Asistida, México, DF, México.

Correspondencia: Dra. Sandra Cubillos García,
scubillos@concibe.com.mx

Recibido: julio, 2011. Aceptado: septiembre, 2011.

Este artículo debe citarse como: Cubillos-García S, Caldiño-Soto F, Pedraza-Cepeda J, Cuneo-Pareto S. Microscopia confocal del huso meiótico de óvulos humanos y su tiempo de recuperación después de la vitrificación. Rev Mex Reprod 2011;4(2):63-67.

www.nietoeditores.com.mx

El huso meiótico es extremadamente susceptible al proceso de criopreservación debido a que la disminución de la temperatura puede inducir la despolimerización de los microtúbulos. El desensamble del huso meiótico está estrechamente asociado con la dispersión de los cromosomas metafásicos y las subsecuentes anomalías cromosómicas. Sin embargo, hay poca información acerca del efecto de crioprotectores en la protección del huso del ovocito durante la condición de temperatura subfisiológica.

La importancia del buen mantenimiento de la estructura del ovocito después del proceso de vitrificación radica en el hecho de que en la meiosis debe ocurrir una correcta separación de las cromátidas hacia los polos durante la anafase, lo que se conoce como disyunción meiótica; cuando esto no ocurre o hay un retraso en la primera o segunda división meiótica, sobrevienen problemas en la configuración de los cromosomas, alterando el número correcto de éstos, es decir, dejan de ser múltiplos básicos del número haploide original de la especie, lo que se conoce como aneuploidía. Para analizar la integridad del huso meiótico se usaron anticuerpos contra tubulinas α y β , las subunidades esenciales de los microtúbulos. Comúnmente, se denomina “tubulina” a un heterodímero formado por dos subunidades (α y β) que al ensamblarse de manera sumamente organizada generan uno de los principales componentes del citoesqueleto, los microtúbulos.

Los ovocitos analizados se encuentran en metafase II con las fibras del huso unidas a los cinetócoros de los cromosomas. Estos últimos están alineados a lo largo del plano ecuatorial de la célula. La primera y segunda metafases pueden distinguirse con facilidad; en la metafase I las cromátidas se disponen en haces de cuatro (tétrada) y en la metafase II lo hacen en grupos de dos (como en la metafase mitótica). Esto no es siempre tan evidente en las células vivas.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los crioprotectores 1,2-propanediol (PROH) y dimetilsulfóxido (DMSO) en la preservación de la estructura del huso y localización de los cromosomas en el ecuador de ovocitos humanos en los tiempos 0, 1, 1.5 y 2 horas después del proceso de descongelación.

MATERIAL Y MÉTODO

Las donantes se sometieron a protocolos convencionales de estimulación ovárica, tras la aspiración folicular y la eliminación de las células de la corona radiada y el cúmulo ooforo, que rodean al óvulo. Se vitrificaron 36 ovocitos en metafase II usando 7.5% de etilenglicol, 7.5% de propanediol y 0.5 mol/L de sucrosa con el método del cryotop. El ensamble del huso meiótico se monitoreó con microscopia confocal de la hora 0 a la 2 después de descongelar los ovocitos, así, seis ovocitos se fijaron a las 0 horas, 12 a la hora 1, 12 a la hora 1.5 y 6 a la hora 2 (Cuadro 1). Como control se fijaron seis ovocitos en metafase II sin vitrificar. Los ovocitos permanecieron en cultivo de microgota bajo aceite en atmósfera de CO_2 a 5% y 37°C hasta el análisis.

Para la inmunohistoquímica los ovocitos se incubaron con los anticuerpos respectivos de la siguiente manera:

1. El ovocito se colocó en 60 μL de solución estabilizadora de microtúbulos previamente calentada a 37°C en un pozo de placa de cultivo celular y se dejó ahí durante 30 a 60 minutos a 37°C.
2. Pasado el tiempo de fijación la célula se transfirió a un pozo con 60 μL de solución bloqueadora y se dejó ahí durante cinco minutos para detener la fijación y cinco minutos más en otro pozo de solución bloqueadora hasta lavar perfectamente el ovocito.
3. La célula se pasó al pozo con 60 μL de anticuerpo primario (monoclonal anti- α -tubulina, anti- β -tubulina o anti-tubulina acetilada) diluido 1:1,000 en solución bloqueadora y se incubó toda la noche a 4°C.
4. El ovocito se lavó en un pozo con 60 μL de solución bloqueadora, y se repitió el lavado en otro pozo con solución bloqueadora fresca.

Cuadro 1. Tratamiento de ovocitos

<i>Tiempo después de la descongelación</i>	<i>PROH/EG</i>
0 (inmediatamente)	6
1 hora	12
2 horas	12
3 horas	6
Total	36
No congelados	6

5. La célula se pasó al pozo con 20 μL de solución bloqueadora y una vez en el pozo se agregaron sobre éste 60 μL del anticuerpo secundario (anti-mouse inmunoglobulina conjugado con FITC Alexa Fluor 488) diluido 1:1,000 en solución; se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad.
6. El ovocito se lavó en un pozo con 60 μL de solución bloqueadora y se repitió el lavado en otro pozo con solución bloqueadora fresca.
7. El ovocito se colocó sobre una laminilla portaobjetos cubierta con poli-L-lisina, y una vez que se observó casi seco, se colocó sobre él una gota de 20 μL de medio de montaje para fluorescencia antifade.
8. Las laminillas se analizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal usando KrArg (405,488 nm) y HeNe (543 nm); las secciones se colectaron a intervalos de 0.6 μm y se reconstruyeron en tres dimensiones para evaluar la forma y longitud del huso meiótico.

El análisis estadístico se realizó con U de Mann-Whitney. El significado se definió como $p < 0.05$.

RESULTADOS

En la evaluación de las láminas se esperaba encontrar cuatro patrones: *a)* huso meiótico bien polimerizado y cromosomas alineados en el ecuador (patrón de normalidad); *b)* huso meiótico bien polimerizado, pero los cromosomas no alineados en el ecuador; *c)* huso meiótico despolimerizado con cromosomas alineados en el ecuador, y *d)* huso meiótico despolimerizado y cromosomas desalineados. Sin embargo, el programa de cómputo sólo nos permitió evaluar la bipolaridad del huso meiótico en esta primera fase. Por las imágenes encontradas decidimos entonces agrupar los patrones en dos grupos: ovocitos con huso meiótico bipolar y ovocitos con huso meiótico desorganizado (Figuras 1 y 2).

Se analizaron 36 ovocitos, como control se usaron seis ovocitos, los cuales mostraron un huso meiótico bipolar al 100%. Después de la desvitrificación se observó una reducción de la bipolaridad del huso meiótico al descongelar (T0): 66.7%, después de una hora de cultivo (T1): 91.6%, después de 1.5 horas de cultivo (T2): 75%, y después de 2 horas (T3): 67% (Cuadro 2). Una hora después de la desvitrificación, la mayor parte de los

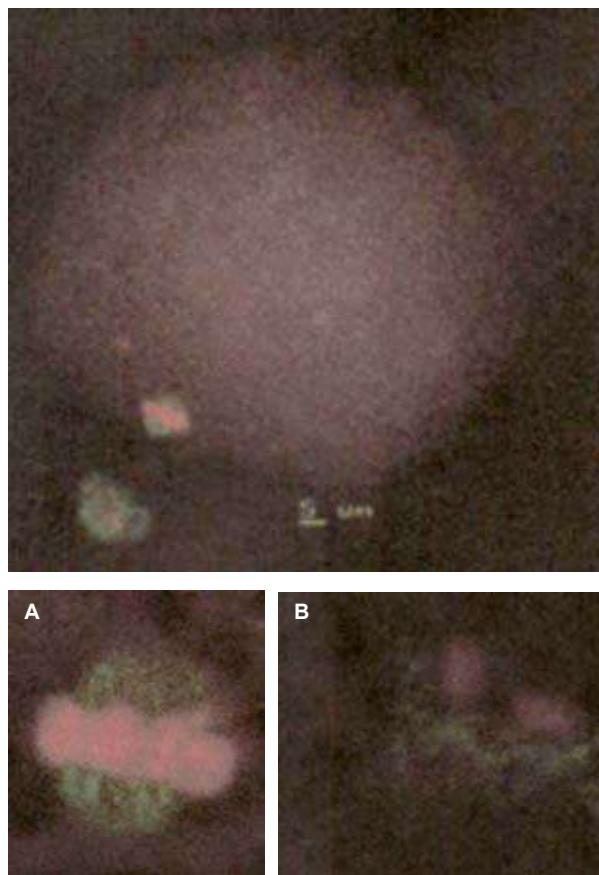


Figura 1. Criterio de normalidad del huso meiótico. Huso meiótico bien estructurado, localizado en la periferia del ovocito, orientado radialmente con el eje longitudinal perpendicular a la membrana plasmática y el corpúsculo polar localizado frente al mismo. **A.** Huso meiótico bipolar con cromosomas alineados en la placa ecuatorial. **B.** Corpúsculo polar.

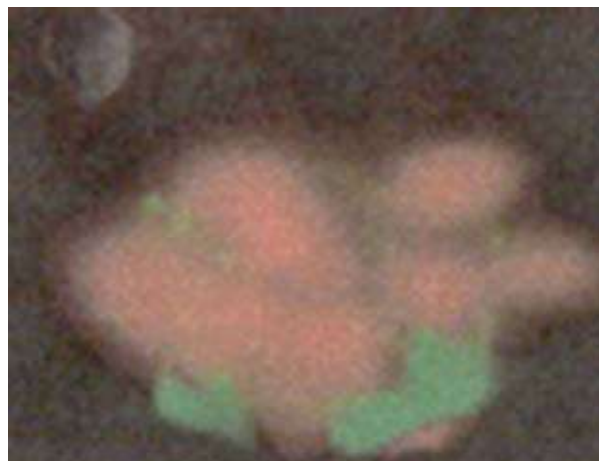


Figura 2. Huso desorganizado con cromosomas desorganizados.

Cuadro 2. Organización del huso meiótico con los diferentes tratamientos después de desvitrificar

<i>Tiempo de descongelación</i>	<i>Núm. de ovocitos</i>	<i>Huso meiótico bipolar</i>	<i>Huso meiótico desorganizado</i>
Ovocitos frescos	6	6/6 (100%)	0/6 (0%)
T0 (0 horas)	6	4/6 (66.7%)	2/6 (33.3%)
T1 (1 hora)	12	11/12 (91.6%)	1/12 (8.4%)
T2 (1.5 horas)	12	9/12 (75%)	3/12 (25%)
T3 (2 horas)	6	4/6 (67%)	2/6 (33%)

ovocitos recuperó la bipolaridad y el alineamiento de los cromosomas; la tubulina se repolimerizó formando husos meióticos bipolares con la placa metafásica alineada.

DISCUSIÓN

La capacidad de congelar ovocitos humanos con garantía de viabilidad y posterior desarrollo embrionario sería una gran herramienta para la reproducción asistida. Aunque se han desarrollado protocolos de alta eficiencia, no hay suficiente evidencia para valorar la seguridad del procedimiento. Las publicaciones de embarazos con ovocitos criopreservados se han recibido con entusiasmo. Sin embargo, los efectos de los diversos pasos implicados en un protocolo de congelación-descongelación en las estructuras del ovocito aún no se han evidenciado totalmente.

Los ovocitos necesitan mantener la estabilidad de varias estructuras para que la fecundación y el desarrollo embrionario ocurran normalmente después de la desvitrificación; sin embargo, se ha reportado que las fibras del huso meiótico y los gránulos corticales se ven afectados por las temperaturas y los crioprotectores.

El huso meiótico estructuralmente organizado es un requisito para que ocurra la segregación normal de cromátides hermanas; al completarse la segunda meiosis ésta es fundamental para la formación de embriones euploides tras la fecundación.

Nuestro estudio complementa los hallazgos de la naturaleza dinámica del huso meiótico y la capacidad de recuperación de éste después de la descongelación. Nosotros evidenciamos que es dependiente del tiempo.

En este estudio se analizó comparativamente mediante microscopia confocal la estructura del huso meiótico de ovocitos criopreservados en metafase II. Las dis-

crepancias observadas en nuestra experiencia respecto al tiempo óptimo para la ICSI ponen de manifiesto las ventajas que otorga el uso de microscopia confocal en este tipo de análisis, al permitir el estudio de la estructura del huso meiótico con un detalle que sobrepasa ampliamente las posibilidades de la microscopia de fluorescencia convencional.

CONCLUSIONES

Hemos documentado algunas características importantes del huso meiótico de ovocitos humanos en metafase II desvitrificados con un análisis de microscopia confocal y análisis de imagen. Estos hallazgos muestran características específicas del huso meiótico que podrían explicar algunas de las deficiencias funcionales que podrían asociarse con el origen de las aneuploidías en el humano. Sin embargo, para la rutina del laboratorio de reproducción asistida hay un mensaje importante: es necesario evaluar el tiempo exacto de recuperación de los ovocitos desvitrificados de acuerdo con el protocolo de cada laboratorio. Otros protocolos de vitrificación podrían exponer a los ovocitos a otras condiciones que deben investigarse para ofrecer estas técnicas a los pacientes. Observamos que una hora después de descongelar los ovocitos, la tubulina se polimeriza poco a poco, formando husos meióticos morfológicamente normales y con un alineamiento adecuado de los cromosomas, la mayor parte recuperó su bipolaridad. Por tanto, sugerimos realizar la ICSI una hora después de desvitrificados los ovocitos. Debido a que ésta es una muestra muy pequeña y con un protocolo específico (PROH+EG), se sugiere realizar más estudios para confirmar estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coticchio G, Sciajno R, Hutt K, Bromfield J, et al. Comparative analysis of the metaphase II spindle of human oocytes through polarized light and high-performance confocal microscopy. *Fertil Steril* 2009;93(6):2056-2064.
2. Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril* 2009;92(4):1306-1311.
3. Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome

- configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002;17(7):1885-1891.
4. Bromfield JJ, Coticchio G, Hutt K, Sciajno R, et al. Meiotic spindle dynamics in human oocytes following slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2009;24(9):2114-2123.
5. Chang C, Sung LY, Lin CJ, Kort HI, et al. The oocyte spindle is preserved by 1,2-propanediol during slow freezing. *Fertil Steril* 2010;93(5):1430-1439.
6. Chang CC, Tian CX, Yang X, Straub RJ, et al. The effect of cryoprotectants on preserving oocyte spindle following sub-physiological temperature treatment. 2007;88(Suppl. 1):S94.
7. Chen C. Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet* 1986;11:884-886.
8. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006;86:78-80.
9. Al-Hasani S, Diedrich K, van Der Ven H, Reinecke A, et al. Cryopreservation of human oocyte. *Hum Reprod* 1987;2:695-700.
10. Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human eggs cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13:3156-3159.
11. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, et al. Human oocyte cryopreservation: new perspective regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411-416.
12. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, et al. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:33-37.
13. Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, et al. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2 propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod* 2005;20(7):1975-1980.
14. Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2005;20(4):1078-1083.
15. Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 2007;2:207-216.
16. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102-108.
17. Zenses MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effect of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindle in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:769-777.
18. Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configuration of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002;17:1885-1891.
19. Cobo A, Perez S, De los Santos MJ, Zulategui J, et al. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod BioMed Online* 2008;1(3):350-359.
20. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The CryoTop method. *Theriogenology* 2007;67:73-80.
21. Duque C, Alfonso J, Cervera R, Monzó A, y col. Efecto del proceso de vitrificación sobre la estructura del huso meiótico y organización cromosómica en ovocitos humanos en metafase. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2010;15(1):15.