

# Obtención de blastocistos humanos por partenogénesis a partir de óvulos criopreservados no inseminados

Ester Polak de Fried,<sup>1</sup> Pablo Ross,<sup>2</sup> Gisela Zang,<sup>1</sup> Andrea Divita,<sup>1</sup> Kerriane Cunniff,<sup>2</sup> Flavia Denaday,<sup>1</sup> Daniel Salamone,<sup>3</sup> Ann Kiessling,<sup>4,5</sup> José Cibelli,<sup>2</sup>

1) CER Instituto Médico, Departamento de Medicina Reproductiva, Buenos Aires, Argentina. - 2) Michigan State University, Department of Animal Science and Physiology, East Lansing, Michigan, United States. - 3) Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. - 4) Bedford Research Foundation, Bedford, Massachusetts, United States. - 5) Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States.

Reproducción 2008;23:9-14

## Resumen

**Objetivo:** el objetivo de esta presentación es reportar el primer caso de obtención de blastocistos partenogenéticos humanos y su adhesión in vitro, generados a partir de la activación química de óvulos criopreservados no inseminados. **Materiales y métodos:** treinta y ocho óvulos frescos no inseminados en metafase II (MII) fueron criopreservados usando el método de congelamiento lento con 1,2 propanediol y 0.3M sacarosa. Los ovocitos fueron provistos por 5 donantes saludables (edad promedio  $32.2 \pm 3.4$ ), quienes, previo consentimiento, se sometieron a una estimulación ovárica controlada y a una aspiración folicular con control ecográfico. Después del descongelamiento, los óvulos fueron activados con 10uM de Ionomicina y 2mM de 6-Dimetilamino Purina para inducir la formación de pronúcleos (PN). Los ovocitos activados (partenotes) fueron cultivados a 37°C, 6% CO<sub>2</sub> para lograr la formación de blastocistos. Los blastocistos partenogenéticos fueron ubicados sobre fibroblastos de cordón umbilical humanos mitóticamente inactivo y chequeados a diario para realizar un seguimiento de su crecimiento

y su adhesión. **Resultados:** treinta y seis de 38 ovocitos humanos criopreservados no inseminados sobrevivieron después del descongelamiento (porcentaje de supervivencia: 94.7%). Treinta y uno de 36 ovocitos mostraron un PN (porcentaje de activación: 86.1 %). Treinta de 31 clivaron (porcentaje de clivaje: 96.8%). Tres partenotes en día 6 y 2 en día 7 después de la activación mostraron cavitación. Los blastocistos así formados fueron plateados. Luego de lo cual un partenote exhibió adhesión incipiente y otro mostró adhesión completa. No se observó mayor desarrollo. Quince partenotes clivados no evolutivos fueron plateados en día 9 después de activación. Seis de 15 mostraron adhesión. Dos días después tres continuaron adheridos hasta el día de la presente comunicación (56 días). **Conclusiones:** de acuerdo al presente estudio el alto porcentaje de supervivencia de óvulos criopreservados no inseminados permite un alto porcentaje de formación partenogenética, desarrollo de blastocistos y adhesión. Este acercamiento provee un nuevo desafío para obtener células madres humanas no adultas evitando problemas éticos que surgen con el uso de gametas y embriones humanos. Por otro lado, óvulos humanos criopreservados no inseminados podrían ser una fuente permanente y segura de producción de partenotes evitando así el largo proceso de reclutamiento de donantes, selección y tratamiento. También

**Correspondencia:** Ester Polak  
Teléfono: 4778-1587.  
E-mail: ester\_polak@cermed.com

ofrece la posibilidad de almacenar óvulos inmunológicamente compatibles para su posible utilización futura.

## **Human Parthenogenetic Blastocysts derived from non fertilized cryopreserved human oocytes**

### **Summary**

**Objective:** parthenogenesis is the process through which an oocyte can develop into an embryo in the absence of sperm. The objective of this presentation is to report for the first time the production of human parthenogenetic blastocysts and in vitro attachment, generated from chemical activation of non inseminated cryopreserved human oocytes.

**Materials and methods:** thirty eight non inseminated fresh human metaphase II (MII) oocytes were cryopreserved using the 1,2-propanediol slow freeze - rapid thaw method with 0.3M sucrose and stored in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . The oocytes were provided from five healthy donors (mean age  $\pm$  SD was  $32.2 \pm 3.4$ ) who underwent controlled ovarian stimulation and guided ultrasound oocyte recovery. All donors participating in the present study signed an informed consent form previously approved by the Institutional Review Board on Human Subjects Research and Ethics Committee which had previously accepted the research. After thawing, non inseminated oocytes were activated with 10 $\mu\text{M}$  of Ionomycin and 2mM of 6-Dimethylamino Purine to induce pronucleus (PN) formation. Activated oocytes (parthenos) were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$  in air to achieve blastocyst formation. Parthenos blastocysts were plated on top of mitotically inactive human umbilical cord fibroblasts. All parthenos were checked every day to follow their growth and attachment, and to test the medium renewal as well as having a photographic register. **Results:** thirty six out of 38 cryopreserved non inseminated oocytes survived after thawing (survival rate: 94.7%). Thirty one out of 36 oocytes showed only one PN (activation rate:

86.1%). Thirty out of 31 cleaved (cleavage rate: 96.8%). Three parthenos on day 6 and 2 parthenos on day 7 after activation, showed cavitation. Human partheno blastocyst were plated. After plating one partheno blastocyst exhibited incipient attachment and the other one showed complete attachment. No further development was observed. Fifteen non evolutive cleaved parthenos were plated on day 9 after activation. Six out of 15 showed attachment. Two days after, three parthenos continue attached until the day of the present communication (56 days). **Conclusions:** the use of parthenogenetic human embryos for therapeutically indications (p. e. source of stem cells) could give the countries with ban restrictions towards the use of human gametes and human embryos the possibility to work in this field. On the other hand, cryopreserved non inseminated human oocytes could be a permanent and safe source for parthenos production avoiding, in this way, the long process of donor recruitment, selection and treatment, as well as the possibility to use the oocytes after rechecking the patient of any viral infectious disease. It also offers the possibility to store oocytes highly immunological compatible for own future uses. According to the present study, the high survival rate of non inseminated cryopreserved oocytes allows a high rate of parthenogenetic formation, and also blastocyst development and attachment. This approach provides a new challenge to obtain non adult human stem cells without generating controversial issues.

### **Introducción**

La criopreservación de ovocitos humanos se está transformando lentamente en una práctica diaria de los procedimientos de ART gracias a sus aplicaciones terapéuticas potenciales. Puede ser también una gran fuente de ovocitos para la investigación en diferentes campos.<sup>1-7</sup>

Los usos terapéuticos de las células madre humanas embrionarias derivadas de pre-

embriones viables son muy prometedoras.<sup>8-11</sup> Sin embargo, algunos países están en contra de ellas argumentando dilemas éticos y religiosos. Uno de los protocolos alternativos propuestos podría ser la partenogénesis, en donde el desarrollo embrionario es iniciado sin la contribución espermática.<sup>12-14</sup> Estudios previos han demostrado la posibilidad de obtener células madre de la activación partenogenética de ovocitos de primates no humanos.<sup>14</sup> Un punto importante a aclarar es que a pesar de que la partenogénesis es un método de reproducción en algunos organismos inferiores, los partenotes de mamíferos no logran generar un embarazo exitoso.<sup>15</sup>

Hasta donde sabemos no hay informes mostrando el uso de ovocitos humanos criopreservados no inseminados como una fuente para el desarrollo partenogenético.

El objetivo de este estudio es informar por primera vez el desarrollo de blastocistos partenogenéticos humanos y su adhesión *in vitro* a partir de ovocitos humanos criopreservados no inseminados.

## **Materiales y métodos**

### **Donantes de ovocitos**

Los ovocitos fueron provistos por cinco donantes saludables (edad promedio  $32.2 \pm 3.4$ ).

Todas las donantes que participaron del presente estudio firmaron consentimientos informados previamente aprobados por un Comité de Ética Institucional como así también por Comités externos pertenecientes a *Michigan State University* y *Harvard Medical School*.

Se les realizó a las donantes un chequeo médico completo que consistió en una historia clínica personal y familiar detallada, una evaluación psicológica, un examen ginecológico y una ecografía.

Se realizaron análisis de sangre para chequear HIV, hepatitis B y C, sífilis, y se reali-

zaron análisis de cariotipo como así también un análisis hormonal y general completos.

Luego de la aspiración folicular las donantes fueron periódica y cuidadosamente controladas hasta ser dadas de alta luego de una ecografía de control normal después de la menstruación.

### **Estimulación ovárica**

Se inició una estimulación ovárica controlada en todas las pacientes con análogos de GnRH de acetato de leuprolide subcutáneo desde la fase lutea media del ciclo previo.

La gonadotropinoterapia se realizó con FSH recombinante (Puregon, Organon Argentina), monitorizando la respuesta con ecografías y estradioles tal como lo efectuamos habitualmente.<sup>6</sup> Los criterios de aplicación de la hCG y la aspiración folicular transvaginal fueron también los habituales.

### **Selección de ovocitos**

Una vez que los ovocitos fueron identificados en los fluidos foliculares, fueron transferidos a HTF suplementado con 0,5% de albúmina sérica humana (HSA) y cultivados en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por tres horas.

Se realizó una completa remoción. Sólo los ovocitos que mostraron un cuerpo polar extruido (por lo tanto, presuntamente en el período de metafase II) fueron congelados.

### **Procedimiento de congelamiento/descongelamiento**

Treinta y ocho ovocitos humanos frescos no inseminados en metafase II (MII) fueron criopreservados usando el método de congelamiento rápido con 1,2 propanediol y 0.3M sacarosa.<sup>16</sup>

Todas las gametas fueron lavadas en una solución de PBS suplementada con 30% de Suero Sustituto Sérico (SSS). Luego fueron colocadas en 1,2 PrOH 1.5M con 30% SSS

por 10 minutos. A partir de lo cual los ovocitos fueron transferidos a la solución de capa que contiene 1.5M PrOH, 30% SSS y 0.3M sacarosa, y fueron inmediatamente cargados en pajuelas de plástico y colocados en un *freezer* biológico. En este mismo se redujo la temperatura gradualmente desde 16°C a -6.5°C (-2°C/min) hasta el punto en que se realizó el *seeding* manual. La temperatura continuó bajando hasta -35°C (0.3°C/min). Las pajuelas fueron finalmente sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) y almacenadas para uso posterior.

El procedimiento de descongelamiento se llevó a cabo en temperatura ambiente. Las pajuelas fueron aireadas por 30 segundos y luego sumergidas en un baño de agua a 30°C por 40 segundos. El crioprotector fue removido al transferir los ovocitos a través de concentraciones decrecientes de solución de propanediol (1-0.5M en cada una) conteniendo 0.3M sacarosa, seguido por una disolución de 0.3M sacarosa sola y finalmente lavadas en PBS.

Todas las soluciones fueron suplementadas con 30% SSS. Finalmente, los ovocitos viables fueron cultivados en el medio HTF suplementado con 0.5% HSA a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> por lo menos durante 3 horas antes de la activación.

### Activación ovocitaria artificial

Luego del descongelamiento 36 ovocitos no inseminados fueron partenogenéticamente activados usando una combinación de Ionomicina y 6-Dimetilamino Purina. Fueron expuestos a un medio de manipulación (HTF-Hepes) con 10 uM de Ionomicina sobre una platina a 37°C. Luego los ovocitos fueron ubicados en medio de cultivo KSOM + HSA con 2mM de 6-Dimetilamino Purina. Los embriones partenogenéticos obtenidos fueron cambiados al medio KSOM + HSA y luego a otro medio fresco KSOM + HSA a 37°C, 6% CO<sub>2</sub>. Los blastocistos partenogenéticos fueron colocados

sobre una capa de fibroblastos humanos de cordón umbilical mitóticamente inactivados y cultivados con KO-DMEM suplementado con suero, penicilina/estreptomomicina y aminoácidos no esenciales.

Todos los partenotes fueron periódicamente chequeados para monitorizar su crecimiento y su adhesión. Se llevó un registro diario completo de todo el proceso.

### Resultados

Treinta y seis de 38 ovocitos humanos criopreservados no inseminados sobrevivieron después del descongelamiento (porcentaje de sobrevida: 94.7%). Treinta y uno de 36 ovocitos mostraron un PN (porcentaje de activación: 86.1 %). Treinta de 31 clivaron (porcentaje de clivaje: 96.8%). Luego de la activación tres partenotes en día 6 y 2 en día 7 mostraron cavitación. El porcentaje de formación de blastocistos fue 16.7%. Los blastocistos humanos fueron plateados. Luego de lo cual un partenote exhibió adhesión incipiente y otro mostró adhesión completa. No se observó mayor desarrollo. Quince partenotes clivados no evolutivos fueron plateados en día 9 después de su activación. Seis de 15 mostraron adhesión. Dos días después tres continuaron adheridos hasta el día de la presente comunicación (56 días).

### Discusión

Numerosos estudios publicados han informado acerca del uso de ovocitos criopreservados que fueron congelados para diferentes propósitos.<sup>1, 2, 6, 7, 17-22</sup>

Durante los últimos años el desafío principal en este área ha sido mejorar el porcentaje de sobrevida de ovocitos criopreservados.

El porcentaje de sobrevida de los ovocitos luego de la criopreservación ha sido reportado en un amplio rango (27%-64%). En un estudio previo nosotros hemos reportado un porcentaje de sobrevida del 30% usando 0.1M de sacarosa.

Desde que Fabbri y col reportaron que una más alta concentración de sacarosa (0.3M) mejora drásticamente el porcentaje de sobrevivencia de ovocitos criopreservados (83%), otros autores repitieron el mismo procedimiento con resultados similares.

En el presente estudio usamos 0.3M sacarosa para criopreservar 38 ovocitos frescos no inseminados y el porcentaje de sobrevivencia luego del descongelamiento fue de 94.7%. Estos resultados aportan mayor evidencia a los efectos beneficiosos de altas concentraciones de sacarosa en el porcentaje de sobrevivencia luego del descongelamiento de ovocitos criopreservados.

Hasta la fecha la activación partenogénica de ovocitos fue realizada mayormente en mamíferos incluyendo ratones, cabras, vacas, monos y humanos.<sup>12-15, 23-28</sup>

En lugar de usar embriones fertilizados y viables para investigación este procedimiento podría brindarle a los científicos la oportunidad de trabajar en este campo en países que tienen restricciones en el uso de gametas y embriones humanos.

La mayoría de la literatura publicada concerniente a la activación partenogénica en humanos está basada en el uso de ovocitos con fallas de fertilización luego de procedimientos de IVF/ICSI. Por lo tanto, se trataba de ovocitos humanos no fertilizados, viejos, que fueron expuestos a diferentes técnicas de activación.<sup>23, 24</sup>

Consideramos que este no es el material más apropiado para evaluar la activación partenogénica en ovocitos humanos, ya que estuvieron en contacto con esperma y también sufrieron los efectos adversos del envejecimiento. En nuestro laboratorio 164 de 197 ovocitos humanos frescos fueron activados (porcentaje de activación: 83.25%) para comparar diferentes técnicas de activación (datos que están por ser publicados).

En el presente estudio la fuente de los ovocitos humanos para la activación partenogénica fueron ovocitos humanos crio-

preservados no inseminados y el porcentaje de activación partenogénica fue 86.1%, el porcentaje de clivaje fue 96.8% y el porcentaje de cavitación fue 16.7%.

De acuerdo a este estudio el procedimiento de criopreservación no afecta el porcentaje de activación partenogénica y su posterior desarrollo.

Congelar ovocitos podría ser una buena técnica para la preservación de fertilidad femenina previo a su alteración debido a tratamientos médicos o debido al efecto nocivo del envejecimiento. En el futuro ovocitos humanos criopreservados podrían ser también una fuente valiosa de células madre para aplicaciones terapéuticas con la posibilidad de producir células madre con competencia inmunológica.

Hasta donde se sabe este es el primer reporte sobre la activación partenogénica de ovocitos humanos criopreservados no inseminados.

El alto porcentaje de sobrevivencia de óvulos criopreservados no inseminados permitió un alto porcentaje de formación partenogénica, desarrollo de blastocistos y adhesión.

Actualmente continuamos con los experimentos ya que es nuestro objetivo alcanzar la posibilidad de obtener células madres de esta fuente.

## Referencias

1. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti, PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil. Steril* 1997;68:724-726.
2. Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A, Gomez Gonzalez M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 1998;69: 55-557.
3. Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A. Oocyte cryopreservation program: removal versus non removal of cumulus corona complex. *Fertil. Steril* 1998;70:(Suppl. 1), S148.

4. Parisi MS, Notrica JA, Ford P, Parisi MN, Polak de Fried E. Human oocyte Cryopreservation and its relationship with water permeability at different maturity stages. *Reproductive Technologies* 2001;10:253-255.
5. Parisi MS, Notrica J, Parisi MN, Polak de Fried E. Effects of cryopreservation in hamster oocytes. *Fertil Steril* 2000;74:(suppl.1)S214.
6. Notrica J, Divita A, Neuspiller F, Arenas G, Polak de Fried E. Healthy girl born after cryopreservation of gametes and ICSI in a patient with seminoma. *Reprod Biomed Online* 2004;9:620-622.
7. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Fratto R, Giunchi S, Venturoli S. Oocyte cryopreservation in oncological patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;113S: S14-S16.
8. Shufaro Y, Reubinoff BE. Therapeutic applications of embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18:909-927.
9. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404.
10. Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ. Res* 2002;15;91:866-876.
11. Trounson AO. The derivation and potential use of human embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 2001;13:523-532.
12. Shaw JM, Trounson AO. Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2-propanediol is influenced by temperature, oocyte age, and cumulus removal. *Gamete Res* 1989;24:269-279.
13. Roh S, Malakooti N, Morrison JR, Trounson AO, Du ZT. Parthenogenetic activation of rat oocytes and their development (in vitro). *Reprod Fertil Dev* 2003;15:135-140.
14. Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, et al. Parthenogenetic Stem Cells in Non-human Primates. *Science* 2002;295:819.
15. Vrana KE, Hipp JD, Goss AM, McCool BA, Riddle DR, Walker SJ, et al. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *Pnas* 2003;100:(suppl 1),1911-11916.
16. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: New perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411-416.
17. Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2006;21:370-375.
18. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004;10:251-266.
19. Oktay K, Pelin Cil A, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: A meta-analysis. *Fertil Steril* 2006;86:70-80.
20. Miller KA, Elkind-Hirsch K, Levy B, Graubert MD, Ross SJ, Scott RT. Pregnancy after cryopreservation of donor oocytes and preimplantation genetic diagnosis of embryos in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 2004;82:211-214.
21. Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jové I, Martín P, Perez N, et al. The births of five spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Human Reprod* 2003;18:1417-1421.
22. Borini A, Bonu MA, Cotichio G, Bianchi V, Cattoli M, Flamigni C. Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril* 2004;82:601-605.
23. Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. Phospholipase C causes  $Ca^{2+}$  oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 2004;128:697-702.
24. Nakagawa K, Yamano S, Nakasaka H, Hinokio K, Yoshizawa M, Aono T. A combination of calcium ionophore and puromycin effectively produces human parthenogenones with one haploid pronucleus. *Zygote* 2001;9:83-88.
25. Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Yamauchi T, Ishikawa M. Nuclear dynamics of parthenogenesis of human oocytes: effect of oocytes aging in vitro. *Gynecol Obstet Invest* 2004;58,155-159.
26. Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA. The cytosolic sperm factor that triggers  $Ca^{2+}$  oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC. *Reproduction* 2004;127:431-439.
27. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC: a sperm-specific trigger of  $Ca^{2+}$  oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;129:3533-3544.
28. Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, Wolf E. Mammalian oocyte activation: Lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol* 2001; 45:797-809.