

CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS PARA SU UTILIZACIÓN EN FIV

A. Martino, S.P Leibo

Departament de Patologia i de Producció Animals. Universitat Autònoma de
Barcelona 08193 Bellaterra, Barcelona

Animal Biotechnology and Embryo Laboratory. Univ. of Guelph. Ontario. Canada.

INTRODUCCIÓN

La crioconservación de ovocitos bovinos permitiría evitar en gran medida los problemas logísticos asociados a la FIV, y facilitaría la aplicación comercial de la producción de embriones in vitro en el campo de la ganadería. Sin embargo la crioconservación de ovocitos, y particularmente en el caso de las especies de interés ganadero, es un reto desde el punto de vista criobiológico. A pesar de los numerosos esfuerzos dedicados a este tema en los últimos años, y el nacimiento de terneros a partir de ovocitos congelados, los resultados globales de la técnica son bajos; menos del 3% de los ovocitos crioconservados se desarrollan in vitro hasta la fase de blastocisto.

Existen diversos estudios que demuestran una gran sensibilidad al enfriamiento de los ovocitos bovinos. El potencial de desarrollo hasta la fase de blastocisto disminuye al 50% al exponer ovocitos bovinos madurados in vitro (MIV) a 0°C tan sólo 5 segundos (Martino y col. 1996a). Esta sensibilidad depende de la temperatura y del tiempo de exposición (Martino y col. 1996b). En general no es posible crioconservar mediante técnicas clásicas aquellos estadios embrionarios o, los embriones de especies sensibles al enfriamiento (ver Pollard y Leibo 1994, Leibo y col. 1996). La utilización de velocidades de enfriamiento ultra-rápidas para atravesar el margen de temperaturas más peligrosas para el ovocito podría permitir superar este fenómeno, de forma parecida a la aplicada a embriones de *Drosophila* (Steponkus y col. 1990, Mazur y col. 1992).

MATERIAL Y MÉTODOS

La producción in vitro de embriones a partir de ovarios recogidos en el matadero se realizó siguiendo la metodología descrita por Xu y col. (1992) con ligeras modificaciones. La manipulación de los ovocitos y embriones se realizó a una temperatura de 35°C.

Los detalles del protocolo utilizado están descritos en Martino y col. (1996a). Se utilizaron dos soluciones de agentes crioprotectores (CPA) a base de etilen glicol

(EG). La primera (EG5.5) contenía EG 5,5 M y sacarosa 1,0 M, y la segunda EG 4,0 M y sacarosa 0,5 M. Los ovocitos MIV se expusieron a los CPAs durante 30 segundos a 35°C. Al final del tiempo de exposición, los ovocitos se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Para ello se utilizaron pajuelas de 0,25 ml o rejillas de microscopía electrónica. En este último caso se depositaban grupos de 10-15 ovocitos en la superficie de la rejilla, con un volumen de CPA inferior a 1 μ l, con el objetivo de conseguir la máxima velocidad de enfriamiento hasta alcanzar -196°C.

El calentamiento de las muestras crioconservadas en EG 5.5 se realizó a 37°C en 4 pasos de un minuto, mediante la exposición sucesiva en soluciones de sacarosa 0,5 M, 0,25 M, 0,125 M, y finalmente medio isotónico. Las muestras crioconservadas en EG 4 se calentaron siguiendo el mismo protocolo con la excepción de que el primer paso se realizó en sacarosa 0,25 M.

Para evaluar el efecto de los CPAs algunos ovocitos se expusieron a las soluciones de CPA y se diluyeron inmediatamente de la misma forma que los ovocitos crioconservados. Los controles se mantuvieron a 35°C.

Tras la dilución de los CPAs los ovocitos se fecundaron y cultivaron in vitro durante 8 días para evaluar su desarrollo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de velocidades de enfriamiento ultra-rápidas permite una supervivencia relativamente elevada de los ovocitos crioconservados (Fig. 1). El 40% de los ovocitos crioconservados en rejillas se dividió a las 48 h., y el 15% alcanzó la fase de blastocisto. Este porcentaje fue significativamente superior al obtenido en los ovocitos crioconservados en pajuelas, de los que menos del 1% alcanzó la fase de blastocisto. Los resultados sugieren que la velocidad de enfriamiento que se alcanza con las pajuelas (2500 °C/min como máximo, Rall 1987) no permite superar el efecto de las temperaturas letales para el ovocito. La utilización de rejillas con un volumen muy pequeño de solución permite alcanzar velocidades muy superiores y por tanto superar, al menos parcialmente, el efecto nocivo de las bajas temperaturas.

Los resultados obtenidos fueron muy similares con ambas soluciones de CPA (Fig. 2). Ello sugiere que con las elevadas velocidades de enfriamiento utilizadas, la concentración de CPA no es un factor crítico. La corta exposición a la solución de CPA sumada a la relativamente elevada concentración de EG y sacarosa produce una rápida deshidratación de los ovocitos. Esta deshidratación es probablemente más importante que la cantidad relativamente pequeña de CPA presente en el

citoplasma del ovocito. La alta concentración de solutos que se alcanza contribuye probablemente a la vitrificación intracelular (Rall 1987).

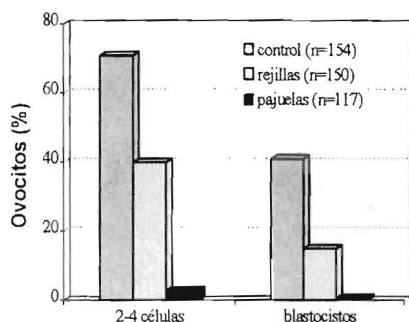


Fig. 1. Supervivencia de los ovocitos crioconservados en rejillas o pajuelas. a,b,c indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

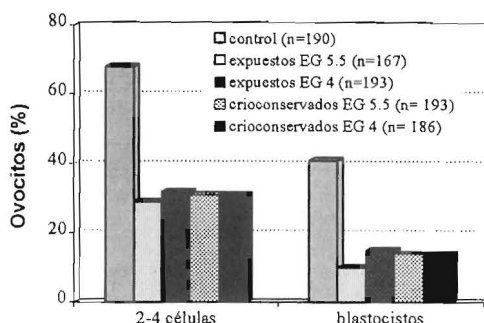


Fig. 1. Supervivencia de los ovocitos expuestos a EG 5.5 o EG 4 o crioconservados en EG 5.5 o EG 4. a,b,c indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La pérdida de viabilidad fue la misma en los ovocitos crioconservados que en los únicamente expuestos a las soluciones de CPA (Fig. 2). Puede suponerse por tanto que el daño celular observado en los ovocitos crioconservados en las rejillas se debe principalmente al efecto nocivo de la solución de CPA. Ello podría explicarse por un efecto tóxico del EG, aunque nuestras observaciones sugieren más bien que fueron los cambios osmóticos dramáticos los responsables de este efecto. La modificación de las soluciones de CPA podría permitir por tanto una mejora de la viabilidad tras la crioconservación.

En conclusión, la utilización de velocidades de enfriamiento ultra-rápidas, combinada con la utilización de soluciones de CPA que permiten una rápida deshidratación, permite superar la extrema sensibilidad al enfriamiento de los ovocitos bovinos. Ello puede abrir la posibilidad de utilizar la crioconservación de ovocitos en el campo de la reproducción bovina.

BIBLIOGRAFÍA

- Leibo y col. 1996. *Anim.Reprod.Sci.* 42:45-53.
 Martino y col. 1996a. *Biol.Reprod.* 54: 1059-1069.
 Martino y col. 1996a. *Molec.Reprod.Develop.* 45: 503-512.
 Mazur y col. 1992. *Science* 258:1932-1935.
 Pollard y Leibo 1994. *Theriogenology* 41:101-106.
 Rall 1987. *Cryobiology* 24:387-402.
 Steponkus et al. 1990. *Nature* 345:170-172.
 Xu y col. 1992. *J.Reprod.Fertil.* 94:33-43.