

FACTORES QUE AFECTAN AL RENDIMIENTO DE LA T.E. CONGELADOS EN EL PROGRAMA GENÉTICO DE OVIARAGON

MJ. Cocero¹, B. Aguilar, J.L. Alabart, J. Olivera, J. Folch

Servicio de Investigación Agroalimentaria. Apdo 727, 50080 Zaragoza.

¹SGIT/INIA. Avda. Puerta de Hierro km 5,9. 28040-Madrid

INTRODUCCIÓN

Los rendimientos reproductivos obtenidos en la aplicación de las técnicas MOET dentro del esquema de selección de la raza Rasa Aragonesa durante 1998 y 1999, han sido inferiores cuando se han utilizado embriones congelados y almacenados (32 y 36% vs 46 y 67% en embriones congelados y frescos respectivamente - Folch y col. 2000). El sistema de conservación utilizado en estos años fue una curva clásica hasta -35°C , tras la crioprotección de los embriones con etilén-glicol (ETG) introducido en 3 pasos (Cocero y col, 1996). Con el fin de equiparar los rendimientos de la transferencia de embriones frescos y congelados y en virtud de resultados experimentales previos (García López, 1999), hemos aplicado un protocolo de adición y retirada de ETG, adecuado al estadio que presentaba el embrión en el momento de ser congelado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 114 embriones, obtenidos a lo largo de los años 2000 y 2001, de hembras superovuladas con 8 dosis decrecientes de Ovagen (ICP); la extracción se efectuó entre 7 y 8 días después de la retirada de la esponja (FGA, Intervet), presentando los embriones estadios de mórula compactada (MC) a blastocisto eclosionado (Ed). Los embriones fueron seleccionados en primer lugar por su estadio y sólo se conservaron aquellos que no presentaban ninguna alteración morfológica (grado 1), o los que tenían algún blastómero excluido de la masa celular principal (grado 2). La manipulación se efectuó en PBS-0,2% BSA (Dulbecco's) a temperatura ambiente, manteniéndose en estas condiciones un máximo de 3 horas hasta su crioprotección.

La adición de ETG se realizó en 2 etapas de 10 min cada una (0,75M y 1,5M), a 29°C ; a continuación fueron refrigerados ($2-4^{\circ}\text{C}$) hasta su congelación, o directamente introducidos en un congelador programable (Biocool). La velocidad de descenso térmico empleada fue: $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 22°C a -7°C ; 10 min de estabilización a -7°C (inducción de la cristalización) y $0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ desde -7°C hasta -35°C . Se mantuvieron 15 min a esta temperatura antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido (LN_2) para su conservación.

Las descongelaciones se realizaron en los días correspondientes a la transferencia de cada grupo de embriones, exponiendo la pajuela 10 s al aire antes de ser sumergida en agua a 30°C . Inmediatamente después se procedió a la retirada del ETG, mediante la inclusión de las MC en una disolución de sacarosa 1M; los blastocistos (B) y los blastocistos eclosionando o eclosionados (Ed) fueron introducidos en concentraciones de sacarosa 0,25 M. Tras un periodo de 10 min, todos los embriones fueron lavados 3 veces en PBS, antes de ser transferidos. Para las mórulas se utilizaron receptoras en día 7 tras la retirada de la esponja (FGA,

Intervet) y en día 8 para todos los blastocistos. Se realizaron ecografías a los 35 días de la transferencia, contabilizándose el nº de fetos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 114 embriones descongelados y transferidos a 57 hembras receptoras, se obtuvo una fertilidad del 73,7% (42 gestantes) y una supervivencia in vivo del 56,1% (64 fetos). Estos resultados son equiparables a los publicados por otros autores que utilizan ETG y 1 M de sacarosa, independientemente del estadio del embrión (McGuinnis y col. 1993) y claramente superiores a los que se logran utilizando GLY o propilénglicol (Schiewe y col. 1991), si bien hay que considerar que en ambos trabajos, el número de transferencias realizadas fue muy escaso.

En el Cuadro 1, que muestra los resultados obtenidos en cada uno de los estadios embrionarios, se observa que la supervivencia de los B es superior a la de las MC y Ed, pero la diferencia entre ellos no es significativa. El rendimiento observado en todos los estadios es mayor que el logrado en trabajos previos, utilizando únicamente 0,25 M sacarosa y en ellos se detectaba una diferencia significativa en la viabilidad postdescongelación de las 2 etapas de desarrollo (Cocero y col., 1996), lo que parece indicar que la concentración de sacarosa utilizada para la retirada del ETG, sí que puede ejercer influencia sobre la viabilidad de los embriones, fundamentalmente si están en etapa de MC. Una mayor presión osmótica favorecería la supervivencia in vivo de este estadio, de forma equivalente al incremento en los índices de desarrollo in vitro detectado en estudios recientes, en que comparamos secuencialmente las 2 concentraciones de dicho azúcar (García López, 1999).

Cuadro 1. Fertilidad y supervivencia embrionaria en embriones congelados en distintos estadios de desarrollo.

Rendimiento	MC	B	Ed	TOTAL
Fertilidad	(12/18) 66,6%	(18/21) 85,7%	(12/18) 66,6%	(42/57)73,7%
Supervivencia	(19/36) 52,7%	(28/42) 66,6% ♥	(17/36) 47,2% ♥	(64/114)56,1%

Datos con ♥ difieren en $P < 0.09$

MC: Mórula compacta; B: Blastocisto; Ed: Blastocisto expandido

Fertilidad: nº de receptoras gestantes / nº de receptoras transferidas

Supervivencia: nº de fetos / nº de embriones transferidos

Aunque en discrepancia con las observaciones de Songsasen y col., (1995), que les llevan a concluir que hay poco efecto del método de dilución del ETG, sobre la tasa de supervivencia final de los embriones ovinos congelados-descongelados, los resultados expuestos en este trabajo apuntan a la existencia de un efecto del sistema de retirada de este crioprotector sobre la supervivencia embrionaria, ampliamente documentado cuando se utiliza Glycerol (Merry y col. 1984; Ware y Boland 1987). Adicionalmente, estos datos experimentales, si bien contradicen

aportaciones de otros autores respecto a la no influencia del estadio de desarrollo en la supervivencia post-descongelación (Tervit and Goold, 1984), ratifican nuestras observaciones previas, de que los rendimientos de la congelación clásica de embriones ovinos difieren en relación con la etapa de desarrollo y aportan una evidencia de que estas variaciones están relacionadas con la permeabilidad de membrana, como apuntaron Széll y col (1989), que se puede mediatizar a través de los protocolos de retirada del crioprotector.

En conclusión, los resultados del trabajo indican la conveniencia de añadir sacarosa 1M, en el líquido de lavado que se emplea para retirar el ETG tras la descongelación de mórulas congeladas con un protocolo clásico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

M.J. Cocero, A. López Sebastián, M.L. Barragán, R.A. Picazo. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocyst crypreserved with ETG or GLY. *Cryobiology* 33: 502-507 (1996).

J. Folch, J. Olivera, B. Aguilar, J.L. Alabart, P. Sánchez, E. Echevoyen, M.J. Cocero. Resultados obtenidos en la transferencia de embriones dentro del programa genético de la U.P.R.A. Carnes Oviaragón. XXV Jornadas Científicas de la SEOC. Teruel, 28-30 de Septiembre de 2000, pp. 559-561.

M. García López Efecto del sistema de crioprotección sobre el índice de desarrollo in vitro de embriones ovinos congelados en distintos estadios. Tesis Doctoral. Veterinaria Complutense de Madrid. 1999

L.K. McGinnis, S.C. Duplantis, Jr and C.R. Youngs. Cryopreservation of sheep embryos using athylene glycol. *Anim. Rprod. Sci.* 30, 273-280 (1993).

D.A. Merry, K.R. Bondioli, R.L. Allen and R.W. Wright, Jr. One-step dilution of frozen-thawed sheep embryos. *Theriogenology* 22, 433-443 (1984)

M.C. Schiewe, W.F. Rall, L.D. Stuart and D.E. Wildt. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology* 36, 279-293 (1991)

N. Songsasen, B.C. Buckereel, C. Plante and S.P. Leibo. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 32, 78-91 (1995)

A. Széll, J.N. Shelton and K. Széll. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 26, 297-301 (1989)

H.R. Tervit and P.G. Goold. Deep-freezing sheep embryos. *Theriogenology* 21, 268 (1984).

C.B. Ware and M.P. Boland Effect of varying glycerol and sucrose concentration combinations on embryo survival rate in a one step cryoprotectant removal from frozen-thawed ovine embryos. *Theriogenology* 27, 721-728 (1987)

Proyecto financiado por CDTI (MINER). Agradecimientos: A E. Echevoyen y P. Sánchez por su colaboración en la obtención de embriones.