RESULTADOS PRELIMINARES DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*.

DE LA FUENTE, J. y GRANADOS, J.

CIT-INIA, Area de Reproducción Animal. Aptdo. 8111. Madrid-28080

OBJETIVOS.

Una de las mayores limitantes para la utilización dentro del Sector Productivo de la tecnología de producción *in vitro* de embriones bovinos son los bajos rendimientos obtenidos después de su descongelación, por otra parte absolutamente necesaria para poder utilizar de forma operativa las ventajas que esta tecnología ofrece dentro de los Programas MOET. En el presente trabajo se presentan resultados preliminares encaminados a tratar de soslayar este problema sin necesidad de utilizar técnicas laboratoriales complejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios bovinos procedentes de matadero fueron transportados en solución salina a 30°C hasta el laboratorio en un intervalo de tiempo aproximado de una hora, donde se aspiraron los folículos de 2-7 mm con jeringa y una aguja de 19G. Solo fueron utilizados aquellos ovocitos que presentaban al menos dos capas de células del cúmulo no expandidas ni picnóticas y un citoplasma homogéneo. Los ovocitos (100/500 µl) son madurados a 39°C en una atmósfera del 5% de CO_2 y del 95% de humedad durante 24 horas. Posteriormente se procede a la fecundación con semen descongelado y separado por swin-up a una concentración de 2 x 10^6 spz/ml, en las mismas condiciones anteriores durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se desprenden las células del cúmulo y los espermatozoides sobrantes y los supuestos embriones se ponen en cultivo en SOF (Synthetic Oviductal Fluid) en microgotas de 50µl (Gomez, E., 1995, Med. Vet., 12, 148.). A partir de las 24 horas del cultivo se añadió un 10% de FCS y el medio de cultivo se cambió cada tres dias.

A los 7-8 días de la fecundación se valoraron morfológicamente los embriones desarrollados y los blastocistos obtenidos fueron tratados para su conservación en nitrógeno líquido, bien mediante una congelación lenta tradicional o por vitrificación. La congelación tradicional se realizó incluyendo a los embriones en glicerol al 10% para someterles a un

descenso inmediato desde la temperatura ambiente hasta -7°C, donde se indujo la cristalización, y posteriormente a una tasa de enfriamiento de -0.5°C/min. hasta -35°C, temperatura a la cual se sumergieron en LN_2. Para la vitrificación los embriones fueron incluidos durante 5 min. en una solución 10% de glicerol, otros 5 min. en 20% etilenglicol y 10% glicerol y finalmente durante 30 seg. en una solución 25% glicerol y 25% de etilenglicol, siendo inmediatamente sumergidos en LN_2 (F.Forcada, 1996. comunicación personal).

La descongelación de los embriones congelados fue realizada bien en tres pasos decrecientes de crioprotector con 0.3M sacarosa o directamente en una solución 1M sacarosa. Los embriones vitrificados fueron descongelados en una solución 0.5M sacarosa directamente dentro de la misma pajuela. En todos los casos se descongelaron al aire por 5-7 seg. y posteriormente en baño maria a 37°C hasta su descongelación.

Una vez descongelados los embriones fueron cultivados en SOF mas 0.3% de BSA en las mismas condiciones indicadas anteriormente durante 72 horas para evaluar su desarrollo in vitro hasta la eclosión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el grupo formado por los embriones congelados de forma tradicional han sobrevivido el 26.8% (11/41). La descongelación en varios pasos solo ha ofrecido un 19% (4/21) de supervivencia mientras que, al ser descongelados en un solo paso, el porcentaje ha subido al 35% (7/20). En el grupo formado por los embriones vitrificados han sobrevivido el 41.6% (15/36). La descongelación en varios pasos ha ofrecido el mayor índice de supervivencia 50% (7/14) y al descogelar en un solo paso el porcentaje ha sido muy similar al de los embriones congelados, 36% (8/22) (Cuadro 1).

Cuadro 1:Resultados de los diferentes métodos de congelación -descongelación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

	Varios pasos (%)	Un paso (%)	Total (%)
Congelados	4/21 (19)[a]	7/20 (35)	11/41 (26.8)[a]
Vitrificados	7/14 (50)[b]	8/22 (36)	15/36 (41.6)[b]
Total	11/35 (31.4)	15/42 (35.7)	26/77 (33.7)

En las columnas,a vs b: $P<0.05$.

Los resultados preliminares obtenidos y presentados en esta nota dan una tendencia inicial que hace pensar que los embriones producidos *in vitro* resultarían menos dañados durante su congelación al ser vitrificados y descongelados en varios pasos.

Después de la descongelación,en el grupo de los embriones congelados se desarrollaron hasta blastocisto expandidos un 26.8% (11/41), de los cuales llegaron a eclosionar el 21.9% (9/41). En el grupo de los embriones vitrificados se expandieron un 41.6% (!5/36) y eclosionaron un 33.3% (12/36). Así el total de embriones expandidos en ambos grupos fue del 33.7% (26/77) y de eclosionados el 27.3% (21/77). El detalle de su desarrollo a las diferentes horas de cultivo se expresa en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Desarrollo de los embriones descongelados.

	Congelados			Vitrificados		
	Expand.	Eclosion	Total	Expand.	Eclosion	Total
24 h.	9	2	11	8	5	13
48 h.	6	5	11	7	8	15
72 h.	2	9	11	3	12	15

En siguientes ensayos habrá de tenerse en cuenta el efecto negativo de la gran cantidad de lípidos presentes en el embrión bovino producido *in vitro* y su gran incidencia sobre la congelabilidad de estos embriones. Así otras técnicas basadas principalmente en la delipidación (Diez C. et al, 1995, Theriogenology, 45, 166) han conseguido muy buenos resultados de desarrollo de embriones congelados por el sistema tradicional, pero se incrementa bastante la manipulación inicial de estos embriones en los primeros estadíos de su desarrollo provocando una posible desviación en la relación de sexos (Gutierrez et al, 1995. Anim. Biotech., 6-2, 101), en absoluto deseable en determinadas condiciones y sobre todo a nivel de ganadero.

La vitrificación parece ser la técnica de elección, aunque sin duda hay que aumentar las réplicas para alcanzar un nivel de fiabilidad alto y por supuesto realizar transferencias como índice último y mas real de la eficacia de las técnicas.