EFECTO DEL ESTADIO DE DESARROLLO EMBRIONARIO SOBRE LA VIABILIDAD IN VITRO DE EMBRIONES VITRIFICADOS DE CONEJO

[1]M.P. VIUDES DE CASTRO, [2]J.S.VICENTE

[1]División de Producción Animal
Escuela Politécnica Superior de Orihuela
Universidad Miguel Hernández
Carretera de Beniel, 03312. Orihuela
[2]Departamento de Ciencia Animal
Universidad Politécnica de Valencia
Camino de Vera,46071-Valencia

INTRODUCCIÓN

Los estadios de desarrollo embrionario temprano muestran una elevada sensibilidad a los efectos de deshidratación osmótica y toxicidad que acompañan a los procedimientos de crioconservación. Al igual que en otras especies, los embriones de conejo que se congelan o vitrifican con éxito corresponden a los estadios embrionarios de mórula y blastocisto temprano. Los estudios realizados tanto por métodos de crioconservación de equilibrio (congelación lenta) o de no equilibrio (congelación rápida o vitrificación, Leibo, 1989) para los estadios de desarrollo temprano (2 células a 16 células) obtienen, en general, moderadas tasas de desarrollo *in vitro* (60-80%, Renard *et al.* , 1984; López-Bejar *et al.* 1994) y bajas tasas de supervivencia (16-26% Maurer y Haseman, 1976; Renard *et al.* 1984). La viabilidad *in vitro* o *in vivo* disminuye considerablemente cuanto los embriones tempranos son sometidos a un procedimiento de ultracongelación o vitrificación si se realizan en una sola etapa a temperatura ambiente (0 a 29% de desarrollo *in vitro*, Smorag *et al.*, 1989; López-Bejar *et al.*, 1994).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las posibilidades de utilización de una solución de vitrificación compuesta por dimetil-sulfóxido y etilenglicol en la crioconservación de distintos estadios embrionarios de conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recuperación de embriones.

Hembras multíparas de la línea V (Unidad de Mejora Genética, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia) fueron inseminadas con semen congelado de machos de la misma línea. Las hembras fueron sacrificadas a las 24-26, 36-38 y 72-74 horas post-inseminación y perfundidos los oviductos y cuernos uterinos (grupo de 72 horas) con 5-10 ml de tampón fostato de Dubelcco (DPBS). Los embriones recuperados fueron catalogados en base a criterios morfológicos, considerándose como normales aquellos embriones que a 24-26 horas se encontraban en estadio de 2-células, a 36-38 horas en estadio 8-16 células y a 72-74 horas en estadio de mórula compactada, presentando una masa de células homogénea y ninguna anomalía en la cubierta de mucina y zona pelúcida. Los embriones normales fueron lavados en DPBS antes de iniciar el proceso de vitrificación.

Vitrificación

Los embriones normales de cada grupo fueron vitrificados en una solución refrigerada a 5ºC de dimetilsulfóxido (20% v/v) y etilenglicol (20% v/v) en DPBS (Vicente y García-Ximénez, 1994) suplementada con 0.2% de BSA. Con anterioridad, al inicio del proceso de vitrificación, los embriones de cada uno de los estadios de desarrollo estudiados fueron pipeteados en 0.2 ml de DPBS, situados en un vidrio de reloj (30mm de diámetro) y refrigerados a 5ºC durante 5 minutos. El procedimiento de vitrificación consta de dos etapas. En la primera, se añadieron 0.2 ml de una solución refrigerada a 5ºc de DMSO (25% v/v) y ETOH (25% v/v) en PBS suplementada con 0.2 g (0.2% w/v) de BSA, en la que una vez mezclada los embriones permanecieron durante 2 minutos a 5ºC (12,5% de dimetilsulfóxido +12,5% de etilenglicol en DPBS +0.1% BSA). En la segunda etapa, se añadieron 0.6 ml de la solución crioprotectora y se agitó el vidrio de reloj durante 30 segundos a 5ºC para asegurar su mezcla. Al finalizar la agitación, los embriones en la solución de vitrificación (20% de dimetilsulfóxido+20% de etilenglicol +0.16% de BSA en DPBS) fueron cargados en la fracción central (0,1 ml) de una pajuela de 0,25 ml (IMV), a ambos lados de esta fracción y separados por aire se situaron dos fracciones de DPBS. Las pajuelas fueron cerradas con un junquillo de plástico identificativo y sumergidas en nitrógeno líquido.

Desvitrificación y eliminación de los crioprotectores.

Los embriones fueron desvitrificados en un baño de agua a 20ºC. La eliminación de la solución de vitrificación se realizó en 4 etapas. En la primera, la fracción central fue vertida en un vidrio de reloj (30mm de diámetro) que contenía 0,4 ml de una solución 0,33 M de sacarosa en DPBS a 20ºC, una vez agitado permanecieron 2 minutos hasta que se realizó una segunda adición de 0.4 ml de la misma solución de sacarosa. Tras 2 minutos, los embriones en 0.2 ml del medio con sacarosa fueron vertidos en un segundo vidrio de reloj que contenía 0.4 ml de DPBS, tras su agitación se procedió a una nueva adición de 0.4 ml DPBS. Al final este proceso los embriones fueron lavados con DPBS y catalogados morfológicamente antes de ser cultivados.

Cultivo de embriones.

El medio y las condiciones de cultivo utilizadas fueron similares a la descritas por Carney y Foote (1991) y López-Bejar *et al.* (1994). El medio utilizado es una mezcla 1:1 (v/v) de los medios RPMI 1640 y DMEM suplementados ambos con un 10% de suero fetal de vacuno y 25 mM de tampón HEPES. Las condiciones de cultivo fueron: 37ºC, 5% de CO2 en aire y humedad a saturación.

Los embriones desvitrificados y catalogados como normales fueron cultivados en 1ml del medio previamente equilibrado (de 8 a 10 embriones). Una vez situados los embriones en el medio de cultivo, éste fue cubierto con aceite mineral.

La evaluación del desarrollo embrionario se realizó a las 84 horas para los estadios de 2 células, a las 72 horas para los embriones de 8-16 células y a las 36 horas para el estadio de mórula compactada.

La tasa de desarrollo alcanzado en cada uno de los grupos de cultivo se evaluó en función del número de embriones que alcanzaban el estadio embrionario de blastocisto al finalizar el cultivo.

Análisis estadístico.

El efecto del estadio de desarrollo sobre la viabilidad de los embriones vitrificados fue analizado mediante un test Chi-cuadrado con corrección de Yates.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestra el porcentaje de embriones desarrollados hasta el estadio de blastocisto *in vitro*, obtenidas durante los periodos de cultivo establecidos para los tres estadios de desarrollo embrionario estudiados.

Tabla 1.- Viabilidad *in vitro* de embriones vitrificados.

Estadios de desarrollo	Embriones vitrificados	Embriones no dañados (%)	Embriones desarrollados (%)
2 células	114	105 (93,8)	12 (11.4)[b]
8-16 células	113	107 (94,7)	76 (71,0)[a]
Mórulas	107	101 (94.4)	77 (76,2)[a]

Embriones desarrollados: embriones en estadio de blastocisto/embriones cultivados.
[a,b] Valores en la columna con diferente superíndice difieren estadísticamente ($P<0.05$).

En general el procedimiento de vitrificación permitió recuperar, tras la desvitrificación y la eliminación de la solución crioprotectora, en torno al 94% de los embriones crioconservados con independencia de su estadio embrionario (tabla 1). No obstante, la solución y el proceso de vitrificación utilizado afectó negativamente la viabilidad de los embriones en estadio de 2 células (11,4% de blastocistos, $P<0.05$) frente a los estadios de 8-16 células y mórula compactada (71,0% y 76,2% repectivamente). La tasa de desarrollo obtenida para los embriones de dos células es semejante a la obtenida por López-Bejar *et al.* (1994) y Smorag *et al.* (1989) para un procedimiento de ultracongelación y de vitrificación en una etapa (11.7% y 0%, respectivamente). Estos últimos autores, observaron que introducir en el procedimiento una etapa adicional de equilibrio eleva la tasa de supervivencia *in vitro* de los embriones de 2 a 16 células (40-90%).

No obstante, la tasa de supervivencia obtenida en el presente trabajo para los embriones de 8-16 células (71%) es superior a las observadas por estos autores en los procedimientos ensayados de una sola etapa (29% y 23% respectivamente) y similares a las obtenidas con procedimientos de ultracongelación y vitrificación en dos etapas. Si bien la tasa de desarrollo *in vitro* no es un buen indicador de las posibilidades de desarrollo *in vivo*, los resultados de supervivencia obtenidos para mórulas compactadas en un anterior trabajo (Vicente y García-Ximénez, 1994) aplicando un procedimiento de vitrificación similar al ensayado en este estudio (65% *in vitro* y 59% *in vivo*), va a permitir iniciar una experiencia para confirmar la posibilidades de aplicación del proceso de vitrificación a embriones de 8-16 células.

BIBLIOGRAFIA

Carney, E.W., Foote, R. H. 1991. J. Reprod. Fert., 91, 113-123.

Leibo, S.P. 1989. Theriogenology, 31, 85-93.

López-Bejar, M., López-Gatius, F., Camón, J., Rutllant, J., Labérnia. 1994. J.Vet. Med. A, 41, 780-790.

Maurer, R.R., Hasseman, J.K 1976. Biological Reproduction, 14, 256-263.

Renard, J.P., Bui-xuan-Nguyen, Garnier, V. 1984. J. Reprod. Fert., 71, 573-580.

Smorag, Z., Gadja, B., Wieczorec, B., Jura, J. 1989. Theriogenology 31, 1227-1231.

Vicente, J.S, García-Ximénez, F. 1994. Theriogenology, 42, 1205-1216.