EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA SOBRE LA SUPERVIVENCIA POST-DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES OVINOS EN DISTINTOS ESTADIOS DEL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL

R.M. García-García; Domínguez, V.; González-Bulnes, A.; Veiga-López, A.; Cocero, M.J.
Dpto. Reproducción Animal. INIA. Avda Puerta de Hierro s/n. 28040- Madrid

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la tecnología de transferencia embrionaria requiere la utilización de métodos de conservación de los embriones, que permitan su almacenamiento a largo plazo, con el fin de que puedan emplearse en el momento deseado (Pollard y Leibo, 1994). Estos procedimientos utilizan agentes crioprotectores para evitar los daños ocasionados por el frío; sin embargo, estos crioprotectores son tóxicos en condiciones fisiológicas, lo que hace necesario su retirada del interior de las células tras la fase de descongelación. En la actualidad y desde hace años, el procedimiento de retirada del crioprotector con un agente no permeable de elevado peso molecular, habitualmente sacarosa, es el más empleado (Leibo, 1989); esta macromolécula, actúa como una fuerza osmótica que restringe el movimiento de agua a través de la membrana, lo que evita el incremento de volumen del embrión que se produciría cuando el crioprotector sale de las células, recuperando su volumen normal tras el paso a una solución fisiológica. Existe una discusión abierta en la literatura científica sobre la concentración de sacarosa que resulta más eficaz para la retirada del crioprotector, que generalmente se relaciona con el agente crioprotector que se utiliza. En este trabajo se plantea como objetivo estudiar de modo comparativo, la influencia de este parámetro en la viabilidad post-descongelación de los embriones ovinos a lo largo del desarrollo preimplantacional, ya que la respuesta a la concentración de sacarosa se halla muy relacionada con la permeabilidad del embrión y esta permeabilidad puede variar entre estadios (Mazur y col., 1976; Cocero y col., 2001).

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 234 embriones en distintos estadios del desarrollo preimplantacional fueron obtenidos, tras el lavado del oviducto (embriones de 2 a 12 células) o del útero (mórulas jóvenes; mórulas compactadas y blastocistos), de ovejas manchegas sincronizadas con un progestágeno y superovuladas con FSHo (Ovagen®, ICP, Auckland, NZ). Una vez evaluados morfológicamente de acuerdo con los criterios de Overström (1996), los embriones de grados 1 y 2 se crioprotegían con etilénglicol (ETG) en concentraciones crecientes (0,75 y 1,5M), se introducían en pajuelas de 0,25 ml (IMV®, L'Aigle, France) y se congelaban mediante una curva de congelación clásica, que comenzaba a 18ºC y disminuía paulatinamente hasta –35ºC, temperatura desde la cual se introducían en nitrógeno líquido.

La descongelación se realizaba de forma rápida, y la retirada del crioprotector con sacarosa (Analar, E; p.m. 342,3 g/mol) se efectuaba en un solo paso. Los embriones de cada estadio se distribuían al azar en dos grupos de retirada del crioprotector, uno con la concentración 0,25M de sacarosa y otro con 1M. Tras 10 minutos en la solución con sacarosa, los embriones se lavaban 3 veces durante 5 minutos en tampón PBS al que se le añadía 20% de suero fetal bovino (Sigma®). Todos los embriones se cultivaron hasta el estadio de blastocisto eclosionado, de modo que los embriones de 2 a 12 células se

cultivaron en monocapas de células epiteliales de oviducto, mientras que los embriones en estadios de mórula y blastocisto se cultivaron en un medio definido (TCM 199 complementado con suero fetal bovino, L-glutamina y gentamicina).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un test de χ^2 sobre tablas de frecuencia de entrada múltiple. Las interacciones entre variables se determinaron con el modelo lineal logarítmico aplicado a tablas de frecuencia (Log-linear model).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los índices de desarrollo *in vitro* hasta eclosión obtenidos en cada estadio, con cada una de las concentraciones de sacarosa utilizadas en la retirada del crioprotector (0,25M ó 1M), se pueden apreciar en la tabla 1. En ella se observa que la concentración 1M ha resultado ligeramente mejor que la 0,25M, tanto en los embriones de estadios tempranos como en las mórulas precompactadas y en las compactadas, mientras que en el caso de los blastocistos la supervivencia ha sido levemente superior para la concentración de sacarosa 0,25M. Sin embargo, la diferencia en la supervivencia de los distintos estadios, entre las dos concentraciones de sacarosa, no alcanzó significación estadística, lo que puede ser debido al escaso tamaño muestral de los grupos individualizados, si bien se evidenció una tendencia a la significación (p=0,06) de este parámetro sobre el índice de supervivencia *in vitro*. Si eliminamos del muestreo el estadio de blastocisto, dado que la influencia de la concentración de sacarosa se ejercería a través de la permeabilidad y dicho estadio es el de mayor permeabilidad, los embriones entre 2 células y mórula compactada sobreviven al proceso de congelación-descongelación significativamente mejor cuando se utiliza 1M de sacarosa que 0,25M ($p<0,05$) en la retirada. Así mismo, tampoco se ha hallado una interacción positiva entre la concentración de sacarosa y el estadio.

Tabla 1: Índice de desarrollo post-descongelación de embriones ovinos en distintos estadios en dos concentraciones de sacarosa utilizadas en la retirada del crioprotector.

	2-4 células	4-8 células	8-12 células	MJ	MC	Total embriones 2células-MC	BI
0,25M S	5,8% (1/17)	29,4% (5/17)	15,0% (3/20)	33,3% (7/21)	38,0% (8/21)	25,0%[a] (24/96)	85,7% (18/21)
1M S	27,7% (5/18)	33,3% (6/18)	27,7% (5/18)	47,6% (10/21)	55.0% (11/20)	38,9%[b] (37/95)	81,8% (18/22)

($a \neq b$; $p<0,05$)

No hemos hallado ningún estudio sobre la supervivencia post-descongelación de embriones ovinos en estadios tempranos en relación a la concentración de sacarosa empleada en la retirada del crioprotector; sin embargo, Merry y col. (1984) y Ware y Boland (1987) indicaron que la concentración 1M es más eficaz en la resistencia tras la descongelación de las mórulas compactadas y blastocistos ovinos. En nuestros resultados, el estadio de blastocisto no parece encontrarse afectado por la concentración

de sacarosa utilizada en la retirada del crioprotector, lo que concuerda con estudios anteriores del grupo (García-López, 2001); posiblemente esto es debido a la gran permeabilidad de esta estructura.

Puesto que las diferencias de permeabilidad existentes entre distintos estadios tanto a nivel fisiológico como estructural, hacen suponer que este parámetro pueda ejercer un efecto significativo sobre la supervivencia de estas estructuras embrionarias, sería necesario ampliar el número de embriones por grupo en el estudio, para determinar definitivamente la influencia de la concentración de sacarosa durante la retirada del crioprotector.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cocero M.J.; Díaz de la Espina; S.; Aguilar B. Ultrastructural characteristics of frozen-thawed and fresh ovine embryos. Biology of Reproduction 2002, 66:1244-1258.

García López, M. 2001. Efecto del sistema de crioprotección sobre el índice de desarrollo *in vitro* de embriones ovinos congelados en distintos estadios. Tesis Doctorales INIA. Serie Ganadera nº5.

Leibo, S.P. 1989. Equilibrium and nonequlibrium cryopreservation of embryos. Theriogenology 31:85- 93.

Mazur, P., Rigopoulus, N., Jackowsky,S.C., Leibo, S.P.1976. Preliminary estimates of permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. Biophys. J. 16:232

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

Pollard, J.W., Leibo, S.P.1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology 41 :101-106.

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

Overström, E.W..1996. In vitro assessment of embryo viability. Theriogenology 45:3-16.