APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE TRANSFERENCIA DIRECTA DE EMBRIONES OVINOS CONSERVADOS MEDIANTE CONGELACIÓN CLÁSICA Y VITRIFICACIÓN

García-García, R.M. [1*], Veiga-López, A.[2], Fuentes-López, F. [1], J.C. Peña[1], Caballero de la Calle, J.R. [1], González-Bulnes, A. [2], Cocero, M.J. [2]

[1] Dpto. de Ciencia y Tecnología Agroforestal. EUITA. Universidad de Castilla La-Mancha. C/Ronda Calatrava 7, 13071- Ciudad Real. [2] Dpto de Reproduccion Animal. INIA. Avda Puerta de Hierro s/n, 28040- Madrid.

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es una herramienta de gran utilidad en los programas de selección genética animal. En la mayoría de las ocasiones se transfieren embriones crioconservados, a los que se le han añadido crioprotectores para evitar los daños provocados por el frío. Estos agentes crioprotectores deben ser retirados del embrión durante la descongelación, puesto que son tóxicos a temperatura ambiente. La posibilidad de transferir embriones directamente desde la pajuela utilizada en la congelación a la hembra receptora permitiría un manejo más eficiente de las receptoras y una mayor flexibilidad (Voelkel y Hu, 1992); además los embriones pueden ser descongelados minimizando la utilización de material de laboratorio y la presencia de personal altamente cualificado en el manejo y evaluación de los embriones. Por lo tanto esta técnica evita las discusiones relativas a la evaluación de los embriones en las transferencias realizadas a nivel comercial, ya que ésta no se realiza (Baril y col., 2001).

En este trabajo se ha estudiado la aplicación de la transferencia directa de embriones ovinos congelados con un método clásico, con o sin inclusión de sacarosa en la pajuela de congelación, o vitrificados con inclusión de galactosa en la pajuela, en condiciones de campo y de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y crioconservación de los embriones

Los embriones fueron obtenidos de ovejas Manchegas sincronizadas con una esponja de acetato de flourogestona (FGA) y superovuladas con ocho dosis decrecientes de la hormona FSH ovina (González-Bulnes y col., 2002), en el dia 6 tras la retirada del progestágeno. Una vez evaluados morfológicamente (Overström, 1996), los embriones se distribuyeron al azar entre tres grupos de crioconservación. En el primero de ellos (control) se realizó una congelación clásica con etilenglicol (ETG) añadido en dos pasos en concentraciones crecientes (Cocero y col., 1996). La pajuela se rellenó con 3 columnas de ETG 1.5 M separada por burbujas de aire, quedando los embriones en la columna central. Las pajuelas se introdujeron en un biocongelador de alcohol y se aplicó una curva de disminución de la temperatura de forma controlada desde 18 ºC hasta –35 ºC, efectuándose la inducción de la cristalización a –7 ºC. El segundo grupo de embriones (ETG + S), fueron

*Dirección actual: Dpto de Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Avda Puerta de Hierro s/n, 28040- Madrid.
Financiado por un proyecto de Investigación UCLM 2004.

congelados con el mismo procedimiento que el grupo control, pero además se incluía sacarosa en la pajuela (modificación del método descrito por Leibo, 1984). Así ésta quedaba finalmente compuesta por una primera columna de PBS suplementado con suero fetal bovino (PBSS), una segunda columna con los embriones en ETG 1.5 M y una última columna con sacarosa 1 M, encontrándose separadas las columnas con burbujas de aire. El tercer grupo de embriones fueron vitrificados con concentraciones crecientes de la mezcla de crioprotectores ETG y glicerol, siendo incluida en la pajuela la macromolécula galactosa (Baril y col., 2001). La pajuela constaba de una primera columna de galactosa, una segunda columna con los embriones en el medio de vitrificación y una última columna con galactosa.

Descongelación, transferencia y cultivo

El método de descongelación de las pajuelas dependió del protocolo empleado para su congelación. Asi, en los embriones control se efectuó exponiendo las pajuelas 10 segundos en aire y 30 segundos en agua atemperada a 32 ºC, siendo posteriormente retirado el crioprotector con sacarosa 1 M en el pocillo durante 10 minutos. Se realizaron tres lavados en PBSS de 5 minutos, y los embriones se transfirieron a las receptoras (n = 11) o fueron cultivados *in vitro* (n = 10). Los embriones del grupo ETG+S fueron descongelados permaneciendo 5 minutos en agua a 37 ºC, siendo agitados vigorosamente con el fin de que se pudieran mezclar las distintas columnas de la pajuela. Los embriones se expelieron sobre un pocillo y se transfirieron a las receptoras (n = 6) o, tras tres lavados en PBSS de 5 minutos fueron cultivados *in vitro* (n = 8) de igual manera que en el grupo anterior. La desvitrificación de los embriones se realizó en agua a 20 ºC durante 10 segundos, agitando para permitir la mezcla de las columnas. Los embriones para la TE se introdujeron directamente en las receptoras (n = 11), mientras que los embriones destinados a cultivo (n = 8) se mantuvieron en un pocillo con el contenido de la pajuela durante 5 minutos, realizándose 3 lavados sucesivos de 5 minutos en PBSS antes de proceder a su cultivo.

Para la TE, un total de 28 ovejas receptoras fueron sincronizadas mediante una esponja de FGA y una dosis de la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG). La TE se realizó depositando dos embriones en el cuerno uterino ipsilateral al ovario que presentaba cuerpo lúteo mediante un Tom-cat. En el día 42 tras la TE se llevó a cabo el diagnóstico de gestación mediante ecografía transabdominal.

El cultivo embrionario se realizó en TCM 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de glutamina (García-García, 2003) en un incubador a 38.5 ºC con el 5% de CO^2 y humedad relativa del 90%. Se efectuaron controles diarios hasta la eclosión de los embriones.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el método de Chi cuadrado, utilizando la corrección de Yates en los casos en los que fue necesario. Se consideró como significación estadística $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados preliminares obtenidos tras la TE indican que el índice de gestación en las hembras a las que se le transfirió embriones control fue mayor al de las receptoras que recibieron embriones vitrificados, aunque la diferencia no alcanzó nivel de significación (63,6 vs 45,4%, N.S.); asimismo fue mayor, mostrando una tendencia a la significación estadística, respecto a las de embriones congelados con sacarosa en la pajuela (63,6 vs 16,6%, P = 0.06). Por otro lado, la supervivencia *in vitro* hasta blastocisto de los embriones cultivados fue semejante para los tres grupos (Tabla 1). Sin embargo, el índice de eclosión fue significativamente menor para los embriones vitrificados que para los del grupo control (0,0 vs 50,0%, P < 0.01), y también menor en relación con la tasa de gestación en las receptoras que recibieron embriones vitrificados (0,0 vs 45,4%, P < 0.05). No tenemos conocimiento de la existencia de ningún trabajo que haya estudiado la comparación de estos tres tipos de congelación. No obstante, estos datos coinciden con los obtenidos por Baril y col. (2001) y Dattena y col. (2004), los cuales indican un índice similar de gestación para los blastocistos vitrificados transferidos directamente que para los controles. Sin embargo, los reducidos resultados obtenidos en este trabajo en la eclosión de los embriones vitrificados no resultan fisiológicamente explicables, y sólo podemos atribuirlo al pequeño tamaño muestral estudiado. Respecto a los resultados hallados para los embriones congelados por el método clásico con inclusión de sacarosa en la pajuela, son similares *in vivo* e *in vitro*, y algo menores a los encontrados por Leibo (1984) en bovino.

Estos resultados preliminares indican la necesidad de continuar con estudios que nos permitan mejorar el rendimiento de los métodos y técnicas utilizados, para optimizar los rendimientos de la transferencia directa.

Tabla 1. Porcentaje de hembras gestantes tras TE e índice de supervivencia a blastocisto y blastocisto eclosionado en cultivo (%) de mórulas congeladas con ETG por el método clásico, congeladas con ETG con inclusión de sacarosa en la pajuela y vitrificadas con adición de galactosa en la pajuela.

Tratamiento	T.E (%)	Cultivo (%)	
		Blastocisto	Eclosionado
Control	7/11 (63,6)	5/10 (50,0)	5/10 (50,0) [a]
ETG+S	1/6 (16,6)	4/10 (40,0)	2/10 (20,0)
Vitrificación	5/11 (45,4)[ac]	3/8 (37,5)	0/8 (0,0) [b]
Total	13/28 (46,4)	12/28 (42,9)	7/28 (25,0)

Distintas letras en distintas columnas indican significación estadística
[ab] P< 0.01, [bc] P<0.05

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baril y col. Theriogenology 2001;56:299-305.
Cocero y col. Cryobiology 1996; 33(5):502-7.
Dattena y col. Theriogenology 2004; 62:481-493.
García-García, R.M. 2003. INIA Tesis Ganaderas, Serie 5.
Gonzalez-Bulnes y col. Theriogenology 2002; 58:1607-14.
Leibo, S.P. Theriogenology 1984; 21:767-790.
Overstrom, E.W. Theriogenology 1996; 45:3-16.
Voelkel, S.A; Hu, Y.X. Theriogenology 1992; 37:23-37.