



## **EUREKA 2573. Desarrollo de un sistema de criopreservación de embriones producidos *in vitro* en un medio de cultivo simple**

### **Investigador responsable**

Dr. Enrique Gómez Piñeiro

### **Organismo**

SERIDA

### **Objetivos**

- Desarrollar y aplicar un sistema eficiente y simple de congelación de embriones producidos *in vitro* por medio de la combinación de un sistema basado en cultivo de embriones en "synthetic oviduct fluid" (SOF) y de un tratamiento de criopreservación que ha demostrado su eficacia con embriones derivados de cocultivos celulares.

### **Equipo investigador**

Dra. Carmen Díez Monforte  
Carlos Hidalgo Ordóñez  
José Manuel Prendes García  
Carlos Méndez Suárez  
Brigitte Marquant-Le Guienne  
Patrice Humblot

SERIDA  
"  
CAGI  
ASCOL  
UNCEIA  
"

### **Otras Entidades Participantes**

Union Nationale de Cooperatives D'Élevage et Insemination Animale (UNCEIA), Services Techniques (Francia).

Cooperativa de Agricultores de Gijón (CAGI) Servicio Veterinario.

Asturiana de Control Lechero S.COOP (ASCOL).

### **Resultados**

Los resultados y las tareas desarrolladas en este proyecto están sometidos a un compromiso escrito de confidencialidad entre los miembros.

## **AGL2001-0379. Estudio de la repercusión de los sistemas de producción de embriones bovinos *in vitro* sobre sus características criobiológicas: desarrollo de dos métodos de criopreservación para ovocitos y embriones**

### **Investigador responsable**

Dra. Carmen Díez Monforte

### **Organismo**

SERIDA

### **Objetivos**

- Desarrollar un sistema de criopreservación de ovocitos que proporcione máximas tasas de embriones viables tras descongelación, fecundación y cultivo *in vitro*, con el fin de ofertar al sector ganadero la posibilidad de almacenar de forma indefinida los gametos de hembras de alto valor genético o de interés zootécnico.

### **Equipo investigador**

Dr. Enrique Gómez Piñeiro  
Carlos Hidalgo Ordóñez  
Lupicinio Prieto Tejerina  
Dra. Lina Fernández Celadilla  
Dra. Maite Carbajo Rueda  
José Manuel Meana Busto

SERIDA  
"  
"  
Univ. León  
"  
ASTURGEN



- Desarrollar un sistema de criopreservación adaptado a embriones producidos *in vitro* y que supere su especial sensibilidad a los efectos del frío.

## Resultados

Los trabajos realizados analizaron la influencia del grado de maduración del ovocito bovino sobre su resistencia a la vitrificación por medio de un protocolo "Open Pulled Straw" (OPS).

### Efecto del estadio del ovocito sobre su sensibilidad a la criopreservación

La fase en que se encuentre el ovocito puede tener un efecto sobre su resistencia a los procesos de criopreservación. Recientemente, Mermillod et al (2000) han obtenido embriones viables después de inhibir durante 24 h la maduración nuclear y prolongando hasta 48 h la maduración citoplasmática, a través de la utilización de roscovitina que es un inhibidor de la actividad del factor promotor de la meiosis (M-phase Promoting Factor kinase -MPF-).

Se pretende la vitrificación por el método OPS de complejos cumulus-ovocito (obtenidos por punción de ovarios procedentes de madero) en diferentes fases del proceso de maduración nuclear y citoplásmica.

Se ha llevado a cabo una parte de los ensayos de desarrollo embrionario post-desvitrificación (siete grupos experimentales). Tras la descongelación se han realizado los siguientes estudios:

Capacidad para continuar los procesos de maduración (en el caso de la criopreservación de ovocitos inmaduros), fecundación y desarrollo *in vitro* hasta día 9.

Viabilidad de los embriones obtenidos a partir de la fecundación de ovocitos criopreservados en las diferentes fases de maduración nuclear y citoplásmica (capacidad de eclosión *in vitro*).

Fijación y estudio de la ultraestructura de ovocitos tras criopreservación (en proceso en la Facultad de Veterinaria de León). Estos análisis informarán sobre:

- el *cumulus oophorus*: conexiones intercelulares y morfología de las células del cumulus.
- el ovocito: presencia, integridad y distribución de orgánulos -mitocondrias, vesículas de membrana, complejo de Golgi, retículo endoplásmico liso, microvellosidades-, microgotas de lípidos y gránulos corticales.

Los resultados obtenidos confirman que el ovocito maduro es el que mejor resiste la vitrificación, siendo el único grupo que ha permitido el desarrollo embrionario tras la fecundación hasta la fase de blastocisto eclosionado.

### Efecto del medio de congelación sobre la sensibilidad celular al frío

Uno de los efectos deletéreos más importantes de la criopreservación de células es la utilización de medios con altas concentraciones de NaCl en la elaboración de las soluciones de congelación (estrés salino). Esta parte del proyecto (en curso) estudia la sustitución total o parcial del NaCl en los medios de criopreservación por Cloruro de Colina durante la preparación de las soluciones de criopreservación para los diferentes protocolos (congelación clásica y vitrificación).

