



Estudio de la repercusión de los sistemas de producción de embriones *in vitro* sobre sus características criobiológicas: desarrollo de dos métodos de criopreservación para ovocitos y embriones

Referencia: AGL2001-0379. Organismo financiador: Ministerio de Educación y Ciencia.
Importe: 101.853,52 €. Duración: 2001–2004.

<i>Equipo investigador</i>	<i>Organismo</i>
Carmen Díez Monforte	SERIDA
Enrique Gómez Piñeiro	SERIDA
Carlos Olegario Hidalgo Ordóñez	SERIDA
Lupicinio Prieto Tejerina	SERIDA
Lina Fernández Celadilla	Univ. de León
Maite Carbajo Rueda	Univ. de León
José Manuel Meana Busto	ASTURGEN

Resumen y resultados

El ovocito y el embrión bovino producido *in vitro* (EPIV) son extremadamente sensibles a la criopreservación, lo que limita sus posibilidades de conservación, y la aplicación de tecnologías reproductivas asistidas. El proyecto se centró en el estudio de algunos de los aspectos que pudieran ser responsables de la sensibilidad a las bajas temperaturas.

Se analizó el posible efecto del estadio nuclear del ovocito y de la composición del medio de maduración (MIV) sobre la sensibilidad de los ovocitos bovinos a la técnica de vitrificación. Con este fin, los complejos "cumulus" ovocito (CCOs) obtenidos de ovarios de matadero, se vitrificaron/desvitrificaron siguiendo el protocolo de Vieira y col. (Cryobiology 2002; 45: 91 - 94), abordándose dos experimentos:

1. se vitrificaron los CCOs en diferentes fases del proceso de maduración *in vitro*: inmaduros, maduros y sometidos a un proceso de inhibición meiótica (premaduración) previa a la maduración.
2. los CCOs se vitrificaron tras haber sido sometidos a tres tratamientos diferentes de maduración *in vitro*:

- a) TCM199 (Tissue Culture Medium), suero fetal bovino (FCS), FSH (hormona folículo estimulante) – LH (hormona luteinizante) y estradiol.
- b) TCM199, FSH - LH, estradiol y polivinil - alcohol (PVA) como reemplazante del FCS.
- c) TCM199, FSH - LH, estradiol y ácido 9-*cis*-retinoico (AR), un derivado de la vitamina A.

Una vez producida la desvitrificación se estudió la capacidad de desarrollo de los CCOs tras fecundación y cultivo *in vitro*. Asimismo, se realizó un estudio ultraestructural de las lesiones provocadas por el proceso de vitrificación en el ovocito y las células del "cumulus" que lo rodean.

Los resultados más destacados son los siguientes:

1. el ovocito bovino en Metafase II (MII, maduro) sobrevivió en mayores porcentajes a la vitrificación.
2. la premaduración del ovocito no mejoró su resistencia a la vitrificación.
3. la eliminación del FCS del medio de MIV y su sustitución por PVA no mejoró la supervivencia del ovocito bovino maduro a la vitrificación.



4. la presencia de AR durante la MIV y su posterior vitrificación tienen un efecto tóxico que se tradujo en la aparición de cuerpos residuales en el citoplasma de las células del "cumulus" y del propio ovocito.
5. la vitrificación produjo lesiones en los ovocitos: alteración de la migración de los gránulos corticales, degeneración mitocondrial, modificación de los gránulos lipídicos y alteración de la distribución citoplásmica de los orgánulos celulares.
6. la vitrificación provocó también importantes lesiones en las células del "cumulus", a saber: alteraciones de la membrana citoplásmica, fenómenos de lisis y apoptosis, agregación de vacuolas citoplásmicas con alteración de la estructura citoplásmica, disminución y degeneración de uniones GAP y degeneración de las mitocondrias y otros orgánulos citoplasmáticos.

En el caso del EPIV se analizaron las interacciones entre el sistema de MIV de los ovocitos, el medio de cultivo, la calidad morfológica y la edad del embrión, y su posible efecto sobre la resistencia a la vitrificación. Para ello, los CCOs obtenidos a partir de ovarios de matadero se sometieron a dos protocolos de MIV:

1. sobre monocapa de células Vero (TCM199, 10% FCS, FSH - LH y estradiol).
2. experimento control (TCM199, 10% FCS, FSH - LH y estradiol).

Trascurrida la MIV y la fecundación, los zigotos se asignaron a tres sistemas de cultivo:

- a) medio sintético semi-definido: SOF + 20 g/L BSA (albúmina bovina).
- b) medio sintético indefinido: SOF + 5% FCS.
- c) co-cultivo con células Vero.

Los blastocistos obtenidos los días 7 y 8 se clasificaron en función de su calidad (calidad 1: una morfología excelente o muy buena; calidad 2: morfología buena o regular). Los embriones

se vitrificaron y se analizó el efecto de las diferentes variables consideradas sobre la supervivencia *in vitro* a la vitrificación.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

1. la sustitución del FCS por altas concentraciones de BSA (20 g/L) en el medio de cultivo mejoró la supervivencia de los EPIV a la vitrificación.
2. los embriones obtenidos en día 7 sobrevivieron a la vitrificación en mayor porcentaje que los obtenidos en día 8 ($p < 0,001$).

Conclusiones

1. la MII es el estadio indicado para la vitrificación del ovocito bovino; no obstante, se precisa profundizar en la criobiología del ovocito.
2. la manipulación de los sistemas de cultivo permite la producción de embriones que sobreviven *in vitro* a la vitrificación/desvitrificación.
3. es necesario contrastar si la mayor supervivencia *in vitro* de los EPIV obtenidos en los medios ensayados se correlaciona con los índices de gestación, una vez hecha la transferencia a receptoras.

