

[REPRODUCCIÓN]

Criopreservación de embriones de ganado vacuno: principios y técnicas

I. Salvador

A. Cebrián-Serrano

Centro de Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA).

E. García-Rosello

Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud (Veterinaria).
Universidad CEU-Cardenal Herrera.

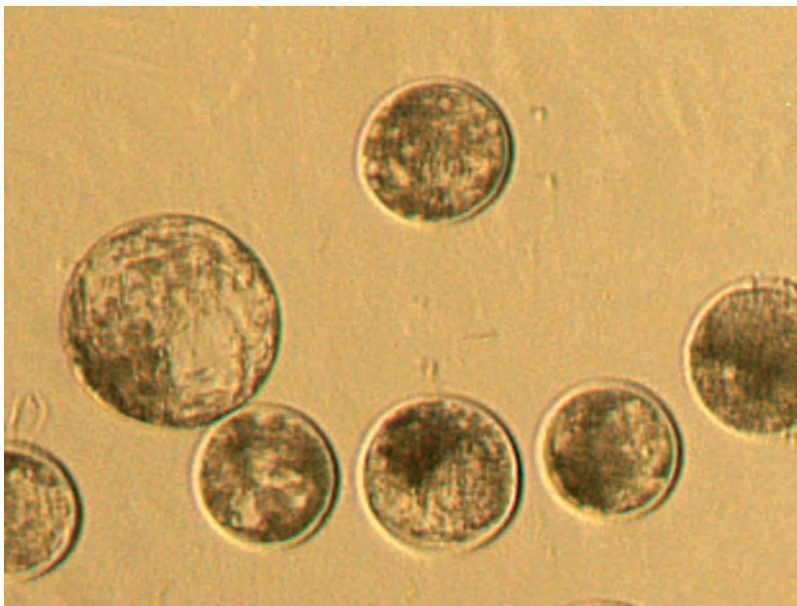
M.F. Simao

Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia.

M. A. Silvestre

CITA-IVIA

El sector lácteo supone aproximadamente un 33% y un 18% de la producción final ganadera europea y española respectivamente, quedando de manifiesto la importancia de este sector en la ganadería tanto europea como española. Solo en 2005, según la Asociación Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS), se produjeron y transfirieron en el mundo más de 600.000 embriones de vacuno producidos in vivo de los cuales más de un 40% (>250.000 embriones) fueron previamente congelados.



Blastocistos de vacuno

De los 600.000 embriones, en Europa se transfirieron un total de 85.287 embriones (~14% del total mundial) de los cuales más del 57% eran congelados. España se encuentra, con algo más de 1.500 embriones transferidos, por detrás de otros países europeos como Francia, Holanda Alemania o Italia, aunque con una tendencia en crecimiento en los últimos años. En cuanto a embriones producidos in vitro, en el año 2005 se transfirieron en todo el mundo aproximadamente 260.000 embriones, siendo aproximadamente el 30% de éstos congelados. (Thibier, 2006).

La transferencia de embriones se ha convertido en una tecnología de aplicación rutinaria en los programas de mejora genética de vacuno y la criopreservación de embriones juega un papel muy importante desde el punto de vista de la mejora genética. La posibilidad de inducir una maduración y ovulación múltiple (proceso denominado superovulación) en el ovario mediante la administración de hormonas permite obtener tasas de hasta 6 viables por lavado y hembra. Los lavados pueden repetirse varias veces por hembra y año, permitiendo así multiplicar la descendencia por animal. La posibilidad de congelar los embriones evita tener que disponer necesariamente de hembras receptoras preparadas y por tanto optimizar la recuperación y transferencia de embriones. El éxito de la transferencia de embriones depende, entre otros factores, de la sincronía entre el estado de desarrollo del embrión y el estado fisiológico reproductivo de la hembra receptora, la congelación de embriones salva las barreras de espacio-tiempo entre la recuperación y gestación y facilita por tanto dicha sincronización.

[Criopreservación de embriones]

Desde los años 70, se ha conseguido congelar embriones con éxito, Wilmut y Rowson obtuvieron, en 1973, el primer ternero



Material para la criopreservación de embriones

Definición

El término de **criopreservación embrionaria** se puede definir como el mantenimiento de los embriones a temperaturas de congelación que permite la inactivación reversible del metabolismo embrionario manteniendo la integridad celular.

vivo a partir de un embrión congelado. En 1977, Willadsen desarrolló un “método estándar” para criopreservar embriones que, con pequeñas modificaciones, es la base de la metodología de congelación lenta que se utiliza hoy en día en distintas especies de mamíferos entre ellas el vacuno (Leibo, 2008). Brevemente este método consiste en los siguientes pasos:

1. suspensión de los embriones en una solución con 10% de crioprotector (entre otros: glicerol (GLY), etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), dimetilsulfoxido (DMSO))
2. inducción de la formación de cristales de hielo (“seeding”) a -7°C
3. enfriar a una tasa de $\sim 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -35°C
4. inmersión de los embriones en nitrógeno líquido (N_2 , -196°C)
5. descongelar con una tasa de calentamiento rápida $\sim 250^{\circ}\text{C}/\text{min}$

La clave para la supervivencia celular a bajas temperaturas radica en la cantidad de agua intracelular, ligado a la capacidad de respuesta osmótica de la célula, que determinará la formación de cristales intracelulares y



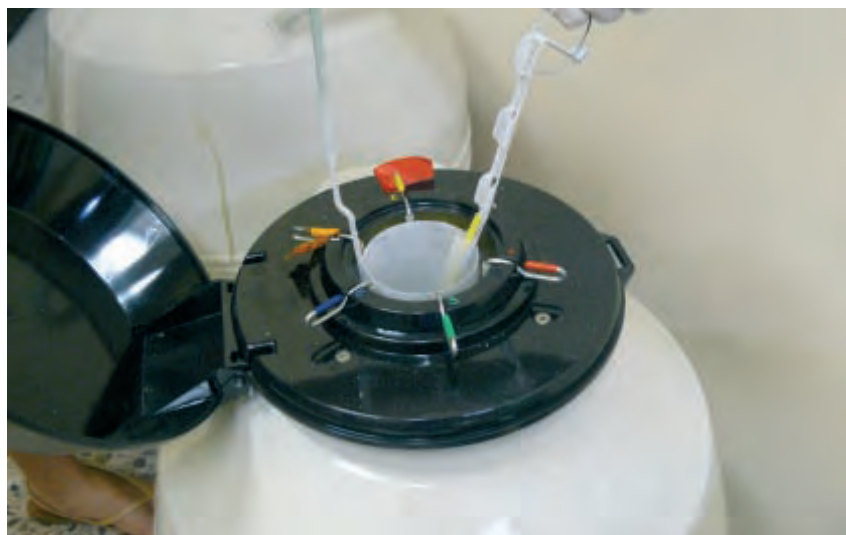
La vitrificación parece ser especialmente apropiada para compensar las diferencias en resultados a la criopreservación entre los embriones producidos *in vivo* e *in vitro*

por tanto el riesgo de daños físicos provocados por estos. El principio que se persigue en la criobiología embrionaria es reducir al máximo la formación de grandes y numerosos cristales de hielo intracelulares, la adición de sustancias crioprotectoras como el GLY, EG, PG, DMSO, metanol y otros reduce la formación de cristales y por tanto ayudan a no sobrepasar el límite fisiológico de deshidratación celular, mejorando así la supervivencia embrionaria post-descongelación. Sin embargo, los crioprotectores son sustancias que ejercen cierta toxicidad y cambios osmóticos sobre los embriones, y tanto la adición como su dilución son pasos clave dentro del proceso de congelación que determinarán la supervivencia embrionaria. Actualmente, los protocolos de congelación lenta más utilizados en vacuno utilizan GLY, EG, PG o una combinación de éstos últimos como crioprotectores a concentraciones variables ($\sim 10\%$).

Una etapa muy importante para la viabilidad del embrión congelado es la descongelación, tras la cual hay que eliminar el crioprotector que, depen-

diendo del empleado en función de su permeabilidad y toxicidad, requerirá de una dilución en más o menos etapas para reducir al máximo los daños provocados al embrión por el estrés osmótico al que se ve sometido durante este proceso de dilución. Este proceso de descongelación de embriones y dilución del crioprotector puede requerir cierto equipamiento laboratorio (medios de dilución, instrumentos de manipulación de embriones y trabajar bajo lupa estereoscópica) dificultándose así la aplicabilidad del método en el momento de la transferencia. La utilización de crioprotectores como el PG y EG, más permeables que el glicerol, ha permitido, desde los años 90, practicar la transferencia directa de los embriones (descongelación en pajuela a 37°C y cargado directamente en el catéter de transferencia, proceso similar a la inseminación artificial) con buenos resultados (Leibo y Mapletoft, 1998). En la actualidad cerca del 90% de los embriones congelados transferidos se hace de forma directa (Thibier, 2006).

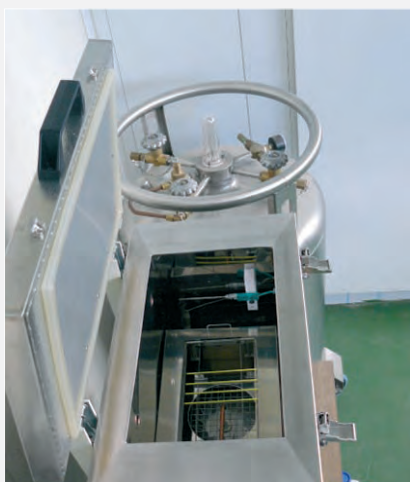
La congelación de embriones producidos *in vivo* ofrece buenas supervivencias y altas tasas de gestación (40-60%), incluso similares a las obteni-



Banco de nitrógeno líquido

das con embriones transferidos inmediatamente tras su recuperación (Rall 1992), sin embargo, su coste es elevado y solo puede ser compensado con un alto valor genético del animal. Además, su disponibilidad está sometida a factores variables como puede ser la respuesta individual de cada animal a los tratamientos hormonales de superovulación. La producción de embriones in vitro a partir de oocitos obtenidos bien mediante la técnica de OPU o a partir de ovarios de matadero permite incrementar sustancialmente la disponibilidad de embriones. En el caso de la OPU, el incremento podría ser de hasta 2 veces los embriones por vaca y año en comparación a los obtenidos por superovulación, y en el caso de material de matadero se pueden obtener entre 30-60 embriones por sesión (dependiendo del número de ovarios). Sin embargo, los embriones producidos in vitro son más sensibles a la criopreservación (Massip, 2003), a mayor calidad de los embriones producidos in vitro se espera que tengan mayor crioresistencia, pero aún queda camino para alcanzar in vitro la calidad de los obtenidos in vivo.

Uno de los obstáculos más importantes para la aplicación a nivel comercial de los embriones producidos in vitro es la falta de una metodología de criopreservación eficiente y de fácil aplicación a nivel de campo para este tipo de embriones. Los métodos de congelación convencional o lenta, que tienen resultados aceptables en embriones producidos in vivo, presentan resultados generalmente bajos con embriones producidos in vitro.



Equipo de criopreservación



Anestesia epidural previa a la transferencia de embriones

Procedimiento de vitrificación

El proceso de criopreservación debe mejorarse para flexibilizar la eficiencia y gestión de los embriones. Una de las vías de mejora es desarrollando un protocolo práctico y eficaz de vitrificación. La vitrificación parece ser especialmente apropiada para compensar las diferencias en resultados a la criopreservación entre los embriones producidos in vivo e in vitro (Vajta y Nagy, 2006).

La vitrificación fue descrita por primera vez en embriones mamíferos por Rall y Fahy (1985). La vitrificación es un método de criopreservación alternativo a la congelación convencional, en el cual los embriones son introducidos en soluciones altamente concentradas de crioprotectores (~ 40%) y sumergidos directamente en el nitrógeno líquido, desde una temperatura superior a los 0°C, alcanzando en pocos segundos la T^a del nitrógeno líquido. De esta manera se logra la solidificación de la solución crioprotectora, producto del aumento extremo de su viscosidad, sin la formación de cristales de hielo. Por un lado, se evita el daño de la formación de cristales, pero por otro se incrementa el daño por toxicidad y choque osmótico.

La vitrificación de embriones se ha logrado con éxito en un número importante de especies de mamíferos (vacuno, conejo, porcino, ovino, caprino, etc). Actualmente, la técnica de vitrificación ofrece unas eficacias (tasa de gestación) similares o superiores a las de la congelación lenta (44.5 vs. 45%, Dobrinsky, 2002), sin embargo,

no es necesario disponer de un crioprotector. A pesar de ello, por distintos motivos no es una técnica que se haya implementado de forma rutinaria en su aplicación a campo, principalmente porque dificulta la transferencia directa de los embriones in campo ya requiere de equipamiento laboratorial para el proceso de calentamiento de los embriones y dilución de las altas concentraciones de crioprotectores que se utilizan. Se están estudiando distintos sistemas de vitrificación para los embriones de vacuno que permita su transferencia directa (Vajta et al., 1996, Pugh et al., 2000).

Hay varios factores que determinan la eficiencia del proceso de vitrificación y que ofrecen potencial de mejora de los resultados de viabilidad de los embriones vitrificados:

- El tipo de crioprotector
- La temperatura de la solución vitrificación
- El tiempo de exposición del embrión a la solución con crioprotector antes de sumergirlo en N₂ líquido
- El tipo de soporte de vitrificación que determinará la magnitud de la camisa de vapor que se forma cuando se sumerge en N₂ líquido y por tanto afectará sobre la tasa de enfriamiento
- La calidad y estado de desarrollo del embrión

El tipo de crioprotector empleado es fundamental para la supervivencia del embrión, el etilenglicol (EG) es el más utilizado entre los permeables, sin embargo, su mezcla con DMSO, podría mejorar su eficacia, ya que pa-

rece ser que la permeabilidad de la mezcla de crioprotectores es mejor que las soluciones individuales (Vicente y García-Ximénez, 1994) aunque este trabajo se realizó con embriones de conejo.

La tasa de enfriamiento es un factor clave para el éxito en la vitrificación, a mayor tasa de enfriamiento mayor supervivencia de los embriones tras la vitrificación-calentamiento. Incrementar la tasa de enfriamiento, logrando en último extremo que sea casi instantánea, permitiría reducir la concentración de crioprotectores utilizada y por tanto reducir sus efectos tóxicos. Sin embargo, esta tasa de enfriamiento puede variar con el soporte utilizado, habilidad técnica del personal y el movimiento de inmersión en el N₂ líquido. En la actualidad se está trabajando el desarrollar soportes para la vitrificación que permitan alcanzar mayores tasas de enfriamiento y obtener mejores resultados de supervivencias, por ejemplo: Open Pulled Straw, Cryoloop o Cryotop.

La vitrificación es un proceso relativamente sencillo en comparación con la congelación convencional o lenta, ya que no requiere un congelador programable (que es un equipamiento caro), utiliza microvolumenes de medio de congelación, es un procedimiento rápido y se puede hacer a pie de granja sin más que disponer un banco de nitrógeno, una lupa y los soportes de vitrificación apropiados. Sin embargo, esta técnica no alcanzado los niveles de aplicación práctica de los procedimientos de congelación convencional.

Este trabajo ha sido financiado por el INIA (RTA2007-0110-00-00) y el Fondo Social Europeo.

Bibliografía

Thibier M. IETS Newsletter, 2006, 24 (4).
Wilmot I., Rowson LEA. Veterinary

Records; 1973; 92:686-90.

Willadsen S. In: Elliot K, Whelan J, editors. The freezing of mammalian embryos. Amsterdam: Elsevier Excerpta Medica; 1977. p 175-210.

Leibo. Theriogenology, 2008. 69:37-47
Leibo S.P. y Mapletoft R.J. In Proc. 17Th Annual Convention of the American Embryo Transfer Association (AETA), October, San Antonio, Texas, AETA, Hastings, 1998. Nebraska, 91-98.

Rall W.F. Animal Reproduction Science 1992; 28:237-245.

Massip A. Reprod Nutr Dev. 2003 Jul-Aug;43(4):325-30.

Vajta G y Nagy ZP. Reprod Biomed Online. 2006 12(6):779-96.

Vajta G., Hola P., Greve T., Callesen H. Animal Reproduction Science 1996; 45: 191-200.

Pugh P.A., Tervit H.R., Niemann H. Anim Reprod Sci. 2000 Feb 28;58(1-2):9-22.

Dobrinsky J.R. 2002 Jan 1;57(1):285-302.

Vicente J.S. y García-Ximénez F. Theriogenology, 1994. 42:1205-1215. •

1^{ra} cita europea de los profesionales de la ganadería

77 000 Visitantes - 1100 Expositores - 1800 Animales



2, 3, 4 de Octubre de 2008

1 100 bovinos (carne y leche) - 400 ovinos - 300 caballos de tiro
Organización de visitas a ganaderías

Clermont-Ferrand, FRANCIA

E-mail : contact@sommet-elevage.fr Tel : (+33) (0)4 73 28 95 13 - Fax : (+33) (0)4 73 28 95 15

www.sommet-elevage.fr

