

CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS CON ETILENGLICOL VS. GLICEROL

FREEZING OF BOVINE EMBRYOS WITH ETHYLENE GLYCOL VS. GLYEROL

Larocca, C.E. y A. Fernández Tubino

Departamento de Reproducción Animal. Facultad de Veterinaria. Av. Lasplaces 1550 - Montevideo - Uruguay.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Crioprotectores. Cigoto.

ADDITIONAL KEYWORDS

Cryoprotectors. Egg.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar el método de congelación de transferencia directa que utiliza etilenglicol como agente crioprotector con respecto al método convencional que emplea glicerol. Se emplearon 122 embriones de calidad excelente y buena divididos en 2 grupos: a) 64 embriones fueron congelados en una solución de PBS + etilenglicol 1,5 M y transferidos directamente luego de la descongelación en receptoras sincronizadas, b) 58 embriones fueron congelados con el método convencional que utiliza PBS + glicerol 1,36 M. A la descongelación se extrajo el crioprotector utilizando una solución de PBS + sucrosa 1 M y seguido de 3 lavados en PBS isotónico, se cargaron los embriones en pajuelas y se transfirieron en receptoras sincronizadas. Los resultados obtenidos muestran que los porcentajes de gestación para ambos grupos no fueron significativamente diferentes: 59,3 p.100 (38/64) y 54,4 p.100 (31/58) respectivamente; tampoco se encontraron diferencias significativas entre las diferentes etapas de desarrollo embrionario: 60 p.100 (21/35) y 51 p.100 (15/29), 58 p.100 (17/29) y 55 p.100 (16/29) para mórulas y blastocistos del grupo etilenglicol y glicerol respectivamente. Los resultados indican que la técnica de transferencia directa con etilenglicol como agente crioprotector ofrece similares resultados al

método convencional pero tiene la ventaja ser rápido y aplicable en condiciones de campo.

SUMMARY

The objective of this paper was to determine if the faster method of thawing bovine embryos using ethylene glycol as the cryoprotectant could produce satisfactory results compared to the standard glycerol method. Good and excellent quality day 7 morulas and blastocysts (n=122) were divided in 2 groups. a) embryos (n=64) were placed directly into a PBS + 1.5 Methylene glycol freezing solution and after thawing each embryo was transferred directly to one recipient previously synchronized. b) embryos (n=58) were placed directly into a PBS + 1.36 M glycerol solution. After thawing glycerol was extracted by pipeting embryos in a PBS + sucrose 1 M solution. Embryos were then washed three times in isotonic PBS holding medium, reloaded in 0.25 straws and transferred each embryo to one synchronized recipient. Results showed 59.3 p.cent (38/64) y 54.4 p.cent (31/58) for group a) and b) respectively, and according to embryo stage results indicated 60 p.cent (21/35) and 51 p.cent (15/29), 58 p.cent (17/29) and 55 p.cent

(16/29) for morulas and blastocyst stages within ethylene glycol and glycerol group respectively. Results indicate that pregnancy rates for embryos frozen in ethylene glycol are comparable to those frozen in glycerol but have the advantage of a simple and fast thawing procedure.

INTRODUCCIÓN

Los crioprotectores como el glicerol y el DMSO deben ser retirados de los embriones antes de ser transferidos (Jacokowsky *et al.*, 1980; Schneider *et al.*, 1983) ya que una vez en contacto con el fluido uterino isotónico se produce una sobrehidratación que provoca daños celulares irreversibles con la consiguiente muerte embrionaria. Es por esta razón que el crioprotector debe ser extraído en el laboratorio en varios pasos con concentraciones decrecientes lo que implica un proceso largo y tedioso.

Una alternativa rápida y eficiente es colocar los embriones directamente en una solución de PBS con sucrosa de concentración equimolar o levemente menor a la del crioprotector para retirar el mismo en un solo paso (Leibo, 1984). Esta alternativa reduce en forma significativa el tiempo de extracción del glicerol con respecto al método convencional; además permite observar la viabilidad embrionaria a través de los procesos de deshidratación y rehidratación que se observa en los embriones al colocarlos en soluciones PBS-sucrosa y PBS isotónico respectivamente. La desventaja de este método es que es difícil manipular los embriones en soluciones equimolares de sucrosa ya que estos tienden a flotar cerca de la superficie.

El método de *un solo paso* omite la extracción del agente crioprotector fuera

de la pajueta ya que agrega en la misma un medio de dilución conjuntamente con el medio de congelación separados ambos por columnas de aire. Originalmente se describen dos metodologías (Leibo, 1984 y 1986, Renard *et al.*, 1983) la cuales difieren básicamente en la concentración del medio de dilución que siempre es sucrosa siendo los porcentajes de gestación entre un 25 p.100 y 45 p.100. Otros investigadores modifican la técnica colocando los embriones en una mezcla de glicerol y sucrosa (Suzuki *et al.*, 1990; Massip *et al.*, 1984, 1987) obteniendo resultados de 50 p.100 de gestación. Renard *et al.* (1982) incorporan otra variante al agregar una tercera columna de PBS isotónico en la pajueta además de las columnas de sucrosa y glicerol. Con cualquier alternativa el método de un solo paso ofrece grandes ventajas desde el punto de vista práctico al extraer el agente crioprotector de una forma rápida y sencilla. Sin embargo esta metodología no ha tenido mucha aceptación en la industria de la transferencia de embriones posiblemente por la complejidad del proceso de ensamblaje de las pajuelas o por la falta de resultados consistentes.

Otra alternativa aún más práctica es la utilización de crioprotectores como el etilenglicol que poseen alto coeficiente de permeabilidad celular de tal forma que al colocar los embriones descongelados directamente en una solución de PBS isotónica o implantándolos inmediatamente no exista la expansión por sobrehidratación con posterior muerte embrionaria que se observa en el caso del glicerol o DMSO.

La posibilidad de estandarizar un método de criopreservación que permita

CONGELACIÓN DE EMBRIONES

transferir los embriones congelados directamente a las receptoras luego de la descongelación se constituiría sin duda alguna en un método de elección universal. El objetivo de este trabajo es comparar la eficiencia del método de criopreservación que incorpora etilenglicol como agente crioprotector con respecto al método convencional que utiliza glicerol y determinar si la etapa de desarrollo embrionario tiene alguna influencia en los porcentajes de gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS

122 embriones de calidad excelente y buena (Linder y Wright, 1983) fueron congelados y descongelados según dos protocolos de trabajo en función del agente crioprotector utilizado: etilenglicol (EG) (n=64), glicerol (G) (n=58).

PROTOCOLO DE CONGELACIÓN CON ETILENGLICOL (EG)

1. Adición de PBS - EG 1,5 M directamente con 10 min. de equilibración a temperatura de laboratorio.

2. Incorporación de los embriones en pajuelas de 0,25 ml de manera que quede una columna central de PBS - EG separada de dos columnas de PBS isotónico a través de dos pequeñas columnas de aire.

3. Inmersión de las muestras directamente a -7°C utilizando una congeladora de embriones programable automática con metanol como medio refrigerante.

4. Inducción manual de cristales de hielo en el medio extra celular (*seeding*) a -7°C manteniendo 10 min. a esa temperatura para permitir el equilibrio de las soluciones.

5. Descenso de temperatura a $0,3^{\circ}\text{C}/\text{m}$ hasta -30°C .

6. Inmersión en nitrógeno líquido.

7. Descongelación en baño maría a 30°C .

8. Transferencia no quirúrgica inmediata en receptoras sincronizadas.

PROTOCOLO DE CONGELACIÓN CON GLICEROL (G)

1. Adición de PBS - G 1,36 M directamente con 15 min. de equilibración a temperatura de laboratorio.

2. Cargado de los embriones en pajuelas de 0,25 ml formando una columna central de PBS - G con el embrión separada por 2 columnas de aire y el mismo medio de congelación.

3. Inmersión directamente a -7°C .

4. Inducción manual de cristales de hielo en el medio extra celular (*seeding*) a -7°C manteniendo 10 min. a esa temperatura para permitir el equilibrio de las soluciones.

5. Descenso de temperatura a $0,3^{\circ}\text{C}/\text{m}$ hasta -35°C .

6. Inmersión en nitrógeno líquido.

7. Descongelación en el aire a temperatura de laboratorio.

8. Extracción del glicerol pipeteando los embriones directamente a una solución de PBS - sucrosa 1 Molar durante 15 min.

9. Lavado en 3 baños de PBS isotónico.

10. Evaluación embrionaria.

11. Incorporación de embriones en pajuelas.

12. Implante no quirúrgico en receptoras sincronizadas.

El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía en los días 25, 40 y 56 post implante utilizando un ecógrafo de modo B tiempo completo con

Tabla I. Porcentajes de gestación de embriones congelados con etilenglicol y glicerol. (Pregnancy rates of frozen-thawed bovine embryos in ethylene glycol and glycerol).

Crioprotector	Transferidos	Gestados	(p.100)
1,5 M etilenglicol	64	38	(59,3) ^a
1,36 M glicerol	58	31	(53,4) ^a

p>0,05

transductor lineal de 5 Mhz (Aloka SSD 500, Japón).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla I** y **tabla II**. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de χ^2 . No existieron diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre los grupos congelados con etilenglicol y glicerol. Tampoco se encontraron diferencias entre las diferentes etapas de desarrollo embrionario para cada uno de los crioprotectores.

DISCUSIÓN

Diversas comunicaciones demuestran que el etilenglicol es un efectivo agente crioprotector para embriones de rata, ratón (Miyamoto e Ishibashi, 1977, 1978) y ovejas (Cocero *et al.*, 1982; Tervit y Goold, 1984). En términos generales, cuando embriones que son congelados y descongelados con crioprotectores con bajos coeficientes de permeabilidad como el glicerol o propilenglicol son colocados

directamente en una solución isotónica se produce un daño celular irreversible debido al *shock* osmótico que se produce como consecuencia del rápido pasaje de agua hacia el interior de las células. Este *shock* osmótico puede ser sensiblemente reducido si se utilizan crioprotectores con altos coeficientes de permeabilidad. Szell *et al.* (1989) comunicaron que para embriones bovinos y ovinos el etilenglicol tiene un coeficiente de permeabilidad mayor que el glicerol. Voelkel y Hu (1992) encontraron que la viabilidad en cultivo luego de la descongelación fue mayor para embriones congelados con etilenglicol 1,5 M y rehidratados directamente en Dulbecos PBS suplementado con fracción V de albúmina bovina con respecto a embriones congelados con glicerol 1,4 M, DMSO 1,5 M o propilenglicol 1,5 M. En este estudio se obtuvo un 50 p. 100 de gestación luego de la transferencia directa de embriones congelados con etilenglicol. Looney *et al.*, (1995) comunicaron diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre embriones congelados con EG (43,9

Tabla II. Porcentajes de gestación de embriones congelados con etilenglicol y glicerol según etapa de desarrollo embrionario. (Pregnancy rates of frozen-thawed bovine embryos in ethylene glycol and glycerol according to embryo stage).

Etapa embrionaria	transferidos/gestados	
	EG	G
Mórulas compactas	35/21 (60) ^a	29/17 (58) ^a
Blastocistos	29/15 (51) ^a	29/16 (55) ^a

p>0,05
Las cifras entre paréntesis son porcentajes

CONGELACIÓN DE EMBRIONES

p.100) y G (57 p.100) y encontraron variaciones importantes entre embriones de diferentes donantes con resultados que variaban desde 0 p.100 hasta 70 p.100 de gestación. Dochi *et al.* (1995) obtuvieron un 69 p.100 de gestación usando transferencia directa con etilenglicol y no encontraron diferencias entre diferentes etapas de desarrollo embrionario.

En el presente estudio no existieron diferencias significativas en los porcentajes de gestación entre embriones congelados con etilenglicol y glicerol, resultados que concuerdan con el estudio de Voelkel y Hu (1992) y Dochi *et al.* (1995). Tampoco existieron diferencias importantes entre las distintas etapas de desarrollo embrionario, datos que no con-

cuerdan con el estudio de Looney *et al.* (1995) donde las etapas blastocísticas tuvieron un menor porcentaje de gestación, sugiriéndose que se debe a que el período de equilibración de 10 minutos puede ser excesivo para etapas avanzadas de desarrollo embrionario.

De acuerdo a los resultados obtenidos por otros investigadores y los del presente estudio, el método de implante directo utilizando etilenglicol como agente crioprotector surge como una alternativa rápida, eficaz y práctica como técnica de criopreservación de embriones bovinos. Para que la misma pueda ser de uso universal es necesario profundizar estudios para establecer el tiempo óptimo de equilibración para las diferentes etapas de desarrollo embrionario.

BIBLIOGRAFÍA

- Cocero, M.J., R. Procureur, J. de la Fuente and D. Chupin. 1982. Glycerol or ethylene glycol for cryopreservation of deep frozen ewe embryos. *Theriogenology*, 29: 38.
- Dochi, O., K. Imai and H. Takakura. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*, 38: 179-185.
- Jackowski, S., S.P. Leibo and P. Mazur. 1980. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. Exp. Zool.*, 212: 329-341
- Leibo, S.P. 1984. Osmotic responses of bovine embryos in solutions of sucrose, glycerol, or glycerol-sucrose. *Cryobiology*, 21: 711 abst.
- Leibo, S.P. 1984. A one step method for direct non surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767-790.
- Leibo, S.P. 1986. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25: 166 abst.
- Linder, G.M. and R.W. Wright, Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-441.
- Looney, C.R., D.M. Broek, C.S. Gue, D.J. Funk and D.C. Faber. 1995. Field experiences with bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. *Theriogenology*, abst. 43: 170.
- Massip, A. and P. Van Der Zwalmen. 1984. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet. Rec.*, 115: 327-328.
- Massip, A. and P. Van Der Zwalmen and F. Ectors.

LARocca Y FERNÁNDEZ TUBINO

1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27: 69-79.
- Miyamoto, H and T. Ishibashi. 1977. Survival of frozen- thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fertil.*, 50: 373-375.
- Miyamoto, H and T. Ishibashi. 1978. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 50: 427-432.
- Renard, J.P., Y. Heyman, P. Leymonie and J-C Plat. 1983. Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19: 145 abstr.
- Renard, J.P., Y. Heyman, J-P Ozil. 1982. Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongélation par le transfert cervical des embryons conditionnés une seule fois en paillettes. *Am. Med. Vet.*, 126: 23-32.
- Schneider, U., P. Mazur and S.P. Leibo. 1983. The permeability of day 7 bovine embryos to DMSO or glycerol. *Cryobiology*, 20: 741 abstr.
- Suzuki, T., M. Yamamoto, M. Ooe, A. Sakata, M. Matsuoka, Y. Nishikata and K. Okamoto. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryo refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 34: 1051-1057.
- Szél, A., J.N. Shelton and K. Szell. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology*, 26: 297-301.
- Tervit, H.R. and P.G. Goold. 1984. Deep freezing of sheep embryos. *Theriogenology*, 21: 268.
- Voelkel, S.A. and Y.X. Hu. 1992. Direct transfer of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 37: 23-37.

Recibido: 1-7-96. Aceptado: 18-9-97.