

## EFFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE BSA EN LA SUPERVIVÈNCIA D'EMBRIONS CONGELATS.

Maria José Rosés, Josep Santaló i Vicenç Català.

Dept. Biologia Cel·lular i Fisiologia. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.  
08193 Bellaterra.

### Abstract

#### Effect of BSA concentration on the survival of frozen-thawed embryos.

The effect of the Bovine serum albumin (BSA) concentration on the survival of 2-cell zona-free (-Zp) and zona-intact (+Zp) frozen-thawed mouse embryos was examined. We tested two different BSA concentrations, 4mg/ml and 15mg/ml. Survival of embryos was similar in both BSA concentration groups, however the use of 15mg/ml seemed to reduce the deleterious effect of freezing and thawing the -Zp embryos.

Key words: BSA concentration, freezing mouse embryos.

### Introducció

Ja fa uns quants anys que es va demostrar que embrions de ratolí podien ser congelats, conservats a  $-196^{\circ}\text{C}$  (en Nitrogen líquid) i esdevenir animals perfectament viables després de llur descongelació i transferència a mares adoptives (Wittingham i col., 1972).

L'aparició de noves tècniques, com la caracterització genètica d'embrions o la formació de quimeres, ha fet que sigui necessària la congelació d'embrions de mamífer sense zona pel·lúcida (-Zp) (Gwatking, 1986). La congelació d'aquests embrions és un procés molt més delicat que no pas si estan dins d'una Zp i fa que la seva supervivència després d'un procés de congelació i descongelació sigui molt menor que l'utilitzant una tècnica de congelació convencional. Per tal d'obtenir una millora en la supervivència dels embrions sense Zp es poden seguir dos camins: o bé col·locar els embrions sense Zp en una Zp buida, o bé modificar la tècnica de congelació per tal d'adaptar-la a les necessitats dels embrions sense Zp.

Aquest treball forma part d'un projecte més ampli en el qual es vol caracteritzar genèticament els embrions, la qual cosa ens obliga a criopreservar-los sense Zp. El nostre objectiu és desenvolupar una sèrie de modificacions en un mètode de congelació *standard* per tal de millorar la supervivència dels embrions congelats sense Zp. Un dels paràmetres que a priori sembla que podrien afavorir la supervivència embrionària és la concentració d'albúmina sèrica bovina (BSA).

### Material i mètodes

*Font d'embrions* Els embrions s'han obtingut de femelles híbrides F<sub>1</sub> (CBA/CaxC57B1/6J) sotmeses a un tractament superovulatori convencional d'injecció intraperitoneal de 5 ui de PMSG (gonadotropina sèrica d'euga prenyada) seguida d'una injecció de 5 ui d'HCG (gonadotropina coriònica humana) 48h més tard. Després de la injecció d'HCG es posen les femelles amb mascles, i l'aparellament és controlat al matí següent.

*Obtenció i cultiu d'embrions* 20h després de l'administració d'HCG es recullen els embrions a l'estadi d'una cèl.lula i es deixen en cultiu en medi M<sub>16</sub>. 24h més tard els embrions es troben a l'estadi de dues cèl.lules. En aquest moment els embrions es divideixen en dos grups: embrions amb Zp i embrions sense Zp. Per extreure la Zp s'ha utilitzat Pronasa a una concentració de 0.5mg/ml en medi M<sub>2</sub>.

*Condicions de congelació i descongelació* S'ha emprat com a medi de congelació el medi M<sub>2</sub> suplementat amb dues concentracions diferents de BSA: 4mg/ml i 15mg/ml. Els embrions s'equilibren en medi de congelació a temperatura ambient amb propilenglicol (PROH) 1.5M, que actua com a crioprotector, i sacarosa 0.1M. En aquest medi es transfereixen dins d'una palleta de congelació a un congelador biològic (Planer Kryo 10-1.7) a 20°C programat amb tres rampes de temperatura (Fig. 1): refredament a una velocitat de -2°C/min de 20°C a -7°C temperatura en la qual s'indueix la formació de gel (*ice seeding*) a les mostres; descens a -0.3°C/min de -7°C fins a -30°C; i a -35°C/min de -30°C fins a -150°C temperatura desde la qual els embrions són somergits en Nitrogen líquid (-196°C).

Després d'un temps de conservació (entre una i tres setmanes) els embrions són descongelats en un bany maria a 30°C. El crioprotector es retira utilitzant medi M<sub>2</sub> amb PROH 1M i sacarosa 0.2M, i els embrions es posen a cultivar en medi M<sub>16</sub> durant tres dies (72h), i es controla el seu desenvolupament.

*Criteris de supervivència:* s'han emprat criteris de normalitat morfològica. S'ha realitzat un seguiment dels embrions cada 24h al llarg del desenvolupament embrionari preimplantacional i s'ha considerat que un embrió era mort quan no es dividia. Cal especificar però, que alguns embrions restaven a l'estadi de dues cèl.lules a les 24h de la descongelació, i que a les 48h s'havien dividit arribant a formar un blastocist normal a les 72-96h post-descongelació. Aquests embrions han estat considerats vius.

*Grups controls.* Els controls s'han realitzat posant a cultivar embrions a dues cèl·lules amb Zp i sense Zp en medi M16 durant 72h després d'haver-los fet diversos rentats en medi M2 suplementat amb 4mg/ml o 15mg/ml de BSA segons els casos.

*Tractament estadístic.* S'ha aplicat el test de la  $H^2$  als resultats obtinguts.

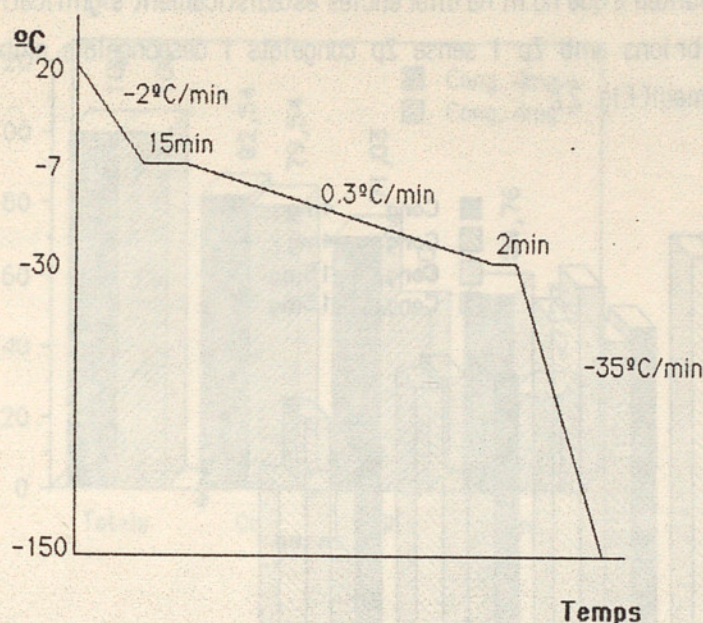


Fig. 1: Programa de congelació d'embrions.

### Resultats i discussió

Els resultats obtinguts poden observar-se a la Taula I.

| Temps | CONTROL    |       |             |       | CONGELATS  |       |             |       |
|-------|------------|-------|-------------|-------|------------|-------|-------------|-------|
|       | BSA 4mg/ml |       | BSA 15mg/ml |       | BSA 4mg/ml |       | BSA 15mg/ml |       |
|       | +Zp        | -Zp   | +Zp         | -Zp   | +Zp        | -Zp   | +Zp         | -Zp   |
| 0h    | 100        | 100   | 100         | 100   | 82.54      | 79.54 | 92.68       | 84.67 |
| 24h   | 97.83      | 92.24 | 80          | 90.12 | 71.03      | 50    | 71.54       | 68.67 |
| 72h   | 87.73      | 70.69 | 72          | 53.09 | 54.76      | 27.27 | 60.98       | 45.33 |

Taula I: Freqüències de supervivència d'embrions control i congelats-descongelats a 4mg/ml i 15 mg/ml de BSA.

Hem estudiat l'efecte de la concentració de BSA en el medi de congelació en termes de supervivència dels embrions després d'una congelació-descongelació, i hem avaluat la influència de la pròpia tècnica de congelació en la supervivència dels embrions amb Zp i sense Zp a les dues concentracions de BSA emprades.

Els nostres resultats apunten a que no hi ha diferències estadísticament significatives entre la supervivència dels embrions amb Zp i sense Zp congelats i descongelats amb 4mg/ml i 15mg/ml de BSA en el medi (Fig. 2).

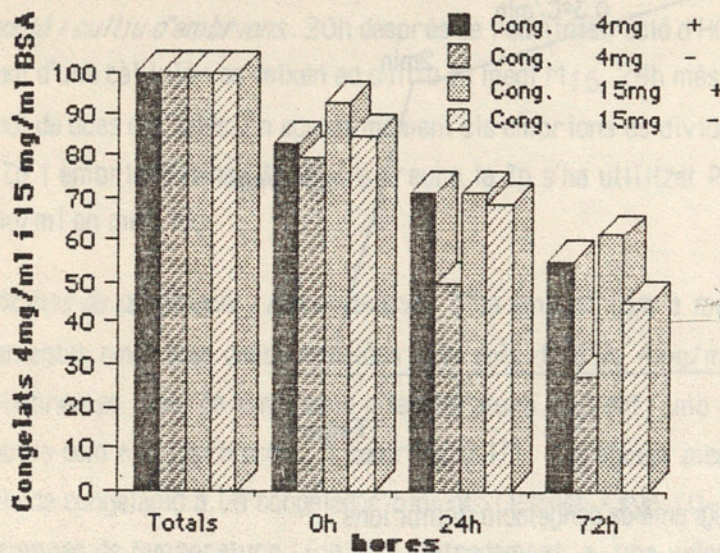


Fig.2: Supervivència d'embrions congelats +Zp(+) i -Zp(-) a 4mg/ml i 15mg/ml de BSA.

Per altra banda, comparant la supervivència dels embrions congelats-descongelats amb Zp i sense Zp, es a dir, estudiant la influència de la Zp en el procés de congelació i descongelació, s'ha observat que hi ha diferències significatives entre els que s'ha emprat 4mg/ml de BSA (Fig. 3), mentre que no hi ha diferències en els que s'ha utilitzat 15mg/ml en el medi.

També s'han apreciat diferències significatives en comparar la supervivència dels embrions controls i congelats amb 4mg/ml de BSA en el medi, tant en embrions amb Zp com amb embrions sense Zp, mentre que fent la mateixa comparació en els controls i congelats amb Zp i sense Zp a 15 mg/ml no s'aprecien diferències significatives.

Això ens fa pensar que si bé no ha estat observada una influència directe de la concentració de BSA en la supervivència dels embrions després d'un procés de congelació-descongelació, sí es pot detectar una reducció dels efectes d'aquest procés en emprar una concentració més elevada

de BSA en el medi de congelació. En tot cas aquesta és una conclusió que caldrà reafirmar tot estudiant un nombre més elevat d'embrions així com altres concentracions de BSA.

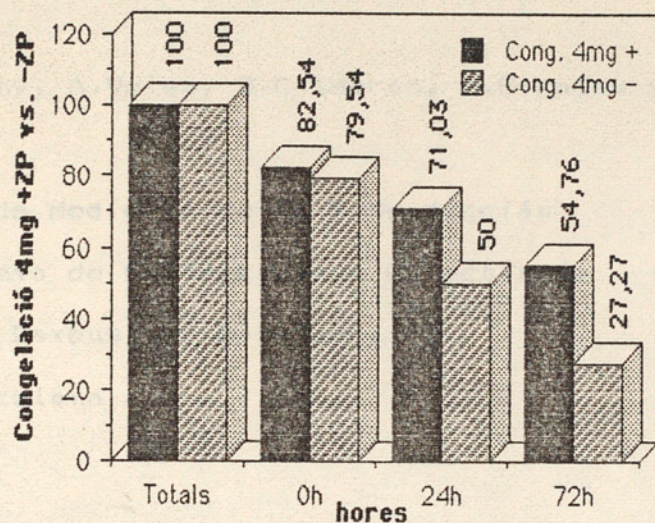


Fig.3: Influència de la Zp en la supervivència d'embrions congelats amb 4mg/ml de BSA en el medi.

#### Bibliografia

GWATKING R.B.L. (ed) (1986) Manipulation of mammalian development. Developmental Biology. A comprehensive synthesis, vol.4. Plenum Press. New York.

WITTINGHAM D.G., LEIBO S.P., MAZUR P., (1972) Survival of mouse embryos frozen to  $-196$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . Science, 178, 411-414.

#### Agraïments

Aquest treball ha estat finançat per la CICYT (projecte nº BT 87/0021). Un de nosaltres (V. Català) treballa en aquest projecte en qualitat de becari del FPI (modalitat reincorporació de doctors).