

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE**  
**CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS OBTENIDOS**  
**IN VIVO E IN VITRO**

**REGGIE G. GUERRA M.**

**4-725-1135**

**DAVID, CHIRIQUÍ**  
**REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**Febrero, 2011**

**EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE  
CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS OBTENIDOS  
IN VIVO E IN VITRO**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO DE MASTER EN CIENCIAS PECUARIAS CON ÉNFASIS  
EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**


**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O  
PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**APROBADO:**

**PROF. DR. REINALDO DE ARMAS**

  
\_\_\_\_\_  
**DIRECTOR**

**PROF. ING. PEDRO GUERRA**

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR**

**PROF. ING. NEFTALÍ APARICIO**

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR**

**DAVID, CHIRIQUÍ**

**REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2011**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente que todo a Dios porque de él procede toda sabiduría y todo logro obtenido en la vida.

A la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), por haberme otorgado el financiamiento (beca), que me permitió participar de la Maestría en Ciencias Pecuarias con énfasis en Producción Animal, principalmente a la Lic. Jane Saldaña, coordinadora de los programas de maestría por su apoyo.

Mi más sincero agradecimiento a todo el personal del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agropecuaria (CIBA), de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, muy especialmente a mi director de tesis Dr. Reinaldo de Armas, que puso en mí toda su confianza y cuyos consejos y conocimientos me facilitaron enormemente el desarrollo de este trabajo; al Ing. Gerardo Sandoya por su ayuda incondicional en la parte de insumos y animales así como también por confiar en mi capacidad en el uso del Laboratorio de Fertilización In Vitro; a los vaqueros Tronco, Tigre, Cholito y Miranda que colaboraron grandemente sobre todo en lo referente a superovulación y sacrificaron parte de su tiempo para la consecución de este trabajo.

También debo expresar mi agradecimiento a los profesores asesores y los profesores de las diferentes asignaturas dentro de la maestría ya que los conocimientos impartidos contribuyeron de una u otra forma en mi formación académica que me permitió finalmente poder culminar satisfactoriamente con este trabajo de tesis.

A todos los miembros de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que de una u otra forma contribuyeron durante el desarrollo de la maestría, especialmente al Decano Dr. Juan M. Osorio el cual en varias ocasiones colaboró para que el programa pudiese continuar adelante a pesar de ciertos obstáculos presentados en el camino.

A Paul Koyner y José Pino, que con su orientación y consejos me ayudaron enormemente en la puesta a punto de la técnica de producción de embriones in vitro.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeros de maestría los cuales hicieron más llevadero el camino, el cual fue tortuoso pero que finalmente valió la pena recorrer, los buenos y malos momentos, ya que de ellos se sacan aprendizajes que hacen que cada día se pueda ser una mejor persona, especialmente al compañero Alex Solís que al final de este recorrido se ha convertido en mi amigo y socio y sin cuya ayuda hubiera sido mucho más difícil el desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradezco a toda mi familia la cual siempre ha estado allí para apoyarme y darme ánimos durante toda mi vida y que son los que me han empujado a seguir en momentos en que parecía que todo era inútil; todos han sido importantes de una u otra forma, pero debo agradecer muy especialmente a mi esposa Leidi y mi hijo José Manuel los cuales no solo me han dado fuerzas para seguir, sino que también han sacrificado mucho para que se lograra esta meta, mi hermano Rogelio que para mí es como un padre y con quien puedo

contar siempre y especialmente mi madre Dalis a quien le debo todo y sé que nunca terminare de pagar todo lo que hace por mí.

A todos muchas gracias.

## DEDICATORIA

Cuando se logra alcanzar una meta en la vida y se analiza todo el camino recorrido, hay muchas personas que han contribuido a que ésta se realice, pero, siempre hay alguien sin cuyo ejemplo, formación y apoyo tal vez nunca hubiésemos sido lo que somos, ni alcanzado las metas propuestas.

Debo decir que en mi caso, ese que me formó, sobre todo con el ejemplo y como no, con uno u otro regaño, fue mi padre Don Estenio Guerra Pittí (Q.E.P.D.), al que debo todo lo que tengo y soy, no solo porque me diera la vida, sino porque fue capaz de forjar en mi los principios y valores que me han permitido llegar a donde he llegado, me demostró como debe ser un padre, un amigo, un consejero, no con palabras, con sus acciones y con su don de gente.

En este momento que alcanzo una de las metas más importantes de mi vida, deseo dedicar este trabajo a su memoria y decirle donde quiera que este, gracias por todo lo que me has dado y espero que te sientas orgulloso de mi.

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la eficiencia de las técnicas de conservación de embriones bovinos por vitrificación o por congelación con equipos programados, sobre la viabilidad post descongelación, utilizando embriones producidos *in vivo* e *in vitro*. Para tal fin se implementaron tres protocolos de criopreservación: congelación lenta con equipo programable utilizando etilenglicol 1.5 Molar (M) como criopreservante, vitrificación con glicerol 6.5 M más 5% de sucrosa y vitrificación con 25% etilenglicol más 25% glicerol; cada protocolo fue aplicado a embriones obtenidos *in vivo* por superovulación y a embriones obtenidos por procedimiento de fecundación *in vitro*, la descongelación en el primer caso se realizó a la intemperie por 10 segundos y luego en agua a 37<sup>0</sup>C por 10 segundos adicionales, en los protocolos de vitrificación se realizó en agua a 30 <sup>0</sup>C por 30 segundos y se retiró el crioprotector en una solución 0.5 M de sucrosa mas 10% de suero fetal bovino durante 5 minutos, obteniéndose finalmente seis tratamientos. Luego de descongelados, se colocaron en grupos de 10 según los tratamientos en medio TCM 199 para su cultivo y evaluación morfológica. Finalmente se evaluó la reconstitución del blastocele a las 12 y 24 horas, la tasa de degeneración a las 12 y 24 horas y la eclosión a las 48 y 72 horas post cultivo. En el caso de la reconstitución del blastocele se encontró que los tratamientos que incluían embriones obtenidos *in vivo* y criopreservados por congelación lenta tuvieron una respuesta positiva mayor al 80% a las 24 horas post cultivo, siendo esto indicativo de que este proceso no afecto en gran medida la integridad del

embrión, contrastando esto con los que se obtuvieron *in vitro* y se vitrificaron en donde las tasas de reconstitución fueron menores al 50%. Para la evaluación de la degeneración embrionaria, los embriones obtenidos *in vivo* presentaron una tasa menor al 30% a las 24 horas post cultivo independientemente del protocolo aplicado en tanto los obtenidos *in vitro* presentaron tasas de degeneración entre 35% con congelación lenta y 56% en caso de vitrificación. Al evaluar la eclosión embrionaria se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) tanto a las 24 como a las 48 horas siendo los tratamientos que involucraban embriones obtenidos *in vivo* los que mejor respondieron a los protocolos (76.67% en congelación lenta y 66.67% y 60% en los casos de vitrificación) comparados con los de embriones obtenidos *in vitro* (56.67%, 36.67% y 40% respectivamente). En base a los datos obtenidos concluimos que los embriones obtenidos *in vivo* presentan mayor tolerancia a los procesos de criopreservación empleados, siendo el protocolo de congelación lenta con el que se observan mejores resultados.

**PALABRAS CLAVES:** Embriones, *in vivo*, *in vitro*, criopreservantes, congelación lenta, vitrificación, eclosión.

## ABSTRACT

The research aim was to evaluate the efficiency of conservation techniques of bovine embryos by vitrification or freezing equipment scheduled on the viability after thawing, using embryos produced *in vivo* and *in vitro*. On this way, three different protocols for cryopreservation were used: slow freezing with ethylene glycol computer programmable using 1.5 Molar (M) as criopreservant, vitrification with 6.5 M glycerol plus 5% sucrose and vitrification with 25% ethylene glycol plus 25% glycerol, each protocol was applied to embryos obtained *in vivo* by superovulation and embryo obtained by *in vitro* fertilization procedure, defrosting in the first case was in the open for 10 seconds and then in water at 37°C for 10 extra seconds; in vitrification protocol's defrosting were performed in water at 30°C for 30 seconds and the cryoprotectant was removed in a 0.5 M sucrose solution plus 10% fetal bovine serum for 5 minutes, finally obtaining six treatments. After thawing, embryos were placed in groups of 10 according to the treatments, in TCM 199 medium for culture and morphological evaluation. In the evaluation of reconstitution of the blastocele at 12 and 24 hours, the rate of degeneration at 12 and 24 hours, and hatching at 48 and 72 hours post culture. For reconstitution of the blastocele was found that treatments that included *in vivo* embryos cryopreserved by slow freezing, had a positive response greater than 80% at 24 hours post culture, this being an indication that this process does not affect large as the integrity of the embryo, contrasting this with those obtained *in vitro* and vitrified where reconstitution rates were below 50%. For the evaluation of degeneration, embryos obtained *in vivo* showed a lower rate to

30% at 24 hours post culture regardless of the protocol applied in both *in vitro* showed degeneration rates between 35% and 56% by slow freezing and vitrification respectively. In assessing embryo hatching showed significant differences ( $P > 0.05$ ) both at 24 and 48 hours being the treatments that included embryos *in vivo* the most responsive to the protocols (76.67% for slow freezing and 60%, 66.67% with vitrification protocols) compared with embryos obtained *in vitro* (56.67%, 36.67% and 40% respectively). Based on the data obtained, we conclude that the embryos obtained *in vivo* show greater tolerance to cryopreservation processes employed applying the slow freezing protocol.

**KEYWORDS:** embryos, *in vivo*, *in vitro*, cryopreservation, slow freezing, vitrification, hatching.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Páginas</b>
<b>PÁGINA DE TÍTULO.....</b>	<b>i</b>
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
<b>1. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Concepto de criopreservación.....</b>	<b>7</b>
<b>2. ANTECEDENTES DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES.....</b>	<b>8</b>
<b>3. IMPORTANCIA DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES.....</b>	<b>11</b>
<b>4. PRINCIPIOS DE LA CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Criopreservantes.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1.1 Intracelulares o permeables.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1.2 Extracelulares o impermeables.....</b>	<b>15</b>

<b>4.2 Función de los criopreservantes.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Métodos de criopreservación.....</b>	<b>16</b>
<b>4.3.1 Refrigeración.....</b>	<b>16</b>
<b>4.3.2 Criopreservación con equilibrio.....</b>	<b>17</b>
<b>4.3.2.1 Congelación lenta.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3.2.2 Criopreservación de un paso.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.2.3 Criopreservación con transferencia</b>	
<b>directa.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.3 Criopreservación no equilibrada.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3.3.1 Criopreservación ultrarrápida.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.3.2 Vitricación.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.3.2.1 Método Open Pulled Straw.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Factores que limitan la efectividad de la</b>	
<b>criopreservación.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.1 Diferencia a la susceptibilidad a criopreservación</b>	
<b>de embriones obtenidos <i>in vivo</i> o <i>in vitro</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 Métodos de descongelación de embriones.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.1 Temperatura de descongelación.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5.2 Extracción del crioprotector.....</b>	<b>49</b>
<b>4.6 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>4.6.1 Sistemas de cultivo embrionario.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7 Evaluación morfológica de embriones.....</b>	<b>55</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>

## INDICE DE CUADROS

CUADRO I. SUSCEPTIBILIDAD A CRIOINJURIAS EMBRIONARIAS DE ACUERDO AL MÉTODO DE CRIOPRESERVACIÓN UTILIZADO.....	39
CUADRO II. COMPARACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DESARROLLO <i>IN VIVO E IN VITRO</i> DE LOS EMBRIONES BOVINOS.....	41
CUADRO III. PROTOCOLO DE FIV UTILIZADO PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> .....	64
CUADRO IV. RECONSTITUCIÓN DEL BLASTOCELE Y DEGENERACIÓN DE EMBRIONES A LAS 12 Y 24 HORAS DE CULTIVO.....	77
CUADRO V. RESULTADOS OBTENIDOS POST DESCONGELACIÓN Y CULTIVO CON EMBRIONES PRODUCIDOS <i>IN VIVO E IN VITRO</i> SOMETIDOS A CONGELACIÓN LENTA.....	80
CUADRO VI. RESULTADOS OBTENIDOS POST DESCONGELACIÓN Y CULTIVO CON EMBRIONES PRODUCIDOS <i>IN VIVO E IN VITRO</i> SOMETIDOS A DOS PROTOCOLOS DE VITRIFICACIÓN.....	81

CUADRO VII. EFECTIVIDAD DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LOS EMBRIONES OBTENIDOS <i>IN VIVO</i> .....	83
CUADRO VIII. EFECTIVIDAD DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LOS EMBRIONES OBTENIDOS <i>IN VITRO</i> .....	85
CUADRO IX. ENTRADA GENERAL DE DATOS AL PROCEDIMIENTO CATMOD.....	87
CUADRO X. ANALISIS DE VARIANZA DE MAXIMA VEROSIMILITUD.....	87
CUADRO XI. CÁLCULO DE LOS ESTIMADOS PARA MAXIMA VEROSIMILITUD.....	88

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. INSTALACIONES DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA.....	58
FIGURA 2. MATERIALES UTILIZADOS PARA LA SUPEROVULACIÓN Y LAVADO.....	60
FIGURA 3. MEDIO DE CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.....	61
FIGURA 4. OBTENCIÓN DE OVOCITOS A PARTIR DE OVARIOS DE MATADERO.....	62
FIGURA 5. ESQUEMA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO A TRAVÉS DEL CICLO DE FIV.....	66
FIGURA 6. MEDIOS UTILIZADOS PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> .....	67
FIGURA 7. EMBRIÓN DE GRADO 1.....	68
FIGURA 8. EMBRIÓN DE GRADO 2.....	68

FIGURA 9. EMBRIÓN DE GRADO 3.....	69
FIGURA 10. EMBRIÓN DE GRADO 4.....	69
FIGURA 11. EMBRIÓN OBTENIDO <i>IN VITRO</i> APTO PARA CRIOPRESERVACIÓN.....	70
FIGURA 12. CRIOPRESERVANTES UTILIZADOS EN EL ENSAYO.....	71
FIGURA 13. EQUIPO DE CONGELACIÓN LENTA.....	72
FIGURA 14. EMBALAJE DE EMBRIÓN EN PAJUELA DE 0.25 CC Y VITRIFICACIÓN.....	73
FIGURA 15. TANQUE DE NITRÓGENO Y EMBRIONES YA CONGELADOS.....	73
FIGURA 16. DESCONGELACIÓN Y CULTIVO POST DESCONGELACIÓN.	74
FIGURA 17. OBSERVACIÓN ESTEREOSCÓPICA POST CULTIVO Y EMBRIÓN ECLOSIONANDO.....	75

## INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de biotecnologías en la reproducción, entre las cuales destacan la superovulación, la fecundación *in vitro* y micro manipulación de embriones, entre otras; se ha logrado dar un gran avance en cuanto al número de embriones que se pueden obtener de una sola vaca de alto valor genético y salvar las limitantes de esta especie, maximizando sus capacidades gaméticas.

Debido a estos avances surgió la necesidad de encontrar técnicas que permitieran preservar estos embriones por un tiempo más largo que el que se acostumbra en programas de transferencia inmediata, y la alternativa más estudiada y aplicada en este sentido es la criopreservación de los mismos, la cual ha permitido que material biológico de diversas especies animales sea almacenado indefinidamente sin pérdida funcional de la actividad y las funciones genéticas (Mazur, 1984).

Dentro de las diferentes técnicas de criopreservación desarrolladas destacan la congelación lenta así como la vitrificación de los mismos, técnicas que permiten la conservación de este material por tiempo prolongado (Gordon, 1994). Incluso Leibo *et al.*, (2002), plantean como factible la idea ambiciosa de mantener viable embriones a temperaturas de -196 °C en nitrógeno líquido durante quizás 1000 años o más.

En tal sentido, García *et al.*, (2000) reportaron el nacimiento de bovinos provenientes de embriones criopreservados y almacenados durante 28 meses, Fogarty *et al.*, (2000); de ovinos durante 13 años; en tanto Márquez-Alvarado *et*

*al.*, (2004), la determinación el índice de apoptosis de embriones bovinos igualmente almacenados durante 16 años.

Sin embargo, en reproducción asistida hay poca necesidad de pensar en la conservación que vaya más allá de algunos meses o años (Gordon, 1996).

La congelación lenta de embriones consiste en bajar la temperatura hasta  $-196^{\circ}\text{C}$ , para ser preservados en nitrógeno líquido utilizando criopreservantes a concentraciones bajas y protocolos de congelación lenta en que el embrión es llevado por pasos a la temperatura final.

En el caso de la vitrificación, el método consiste en un pase directo de la temperatura inicial, a los  $-196^{\circ}\text{C}$  por medio de su inmersión directa en nitrógeno líquido, lo cual se realiza para poder mantener la integridad del embrión, requiriéndose de dosis altas de criopreservantes.

Aunque los resultados de la transferencia de embriones producidos *in vivo* ha logrado alcanzar resultados estables y aunque innegablemente un poco más bajos (Palma, 2008) que si fueran transferidos en fresco (De Armas, 2007), como es lógico por el daño celular que ocurre durante el proceso de crioprotección y enfriamiento queda mucho por investigar para minimizar los mismos; en el caso de los embriones producidos *in vitro*, estos resultados son aún inferiores (Palma, 2008) y muy variables por múltiples causas y resulta hoy en día el principal problema que posee la técnica de FIV para poder ser empleada no solo la conservación de los embriones producidos, sino para el intercambio comercial a gran escala.

La aplicabilidad de las técnicas de criopreservación que se planteó evaluar en este ensayo se justifican sobre la base de estudiar los resultados tanto en embriones producidos *in vivo* como *in vitro*, dado que tanto en uno como en otro sistema de producción de embriones no siempre se cuentan con los animales receptores para que sean transferidos de manera inmediata, ya sea por que los animales receptores se encuentran distantes, o simplemente, por que la intención de la obtención de múltiples embriones es de conservar el material por un tiempo prolongado hasta que se tengan las condiciones para realizar la transferencia o ser empleados para intercambio comercial dentro del país o internacionalmente y estas técnicas indudablemente constituyen una herramienta de soporte en estos casos. Por otra parte el empleo de la vitrificación nos permitiría el obviar la necesidad del empleo de equipos de congelación costosos y pudiera ser empleada incluso a nivel de fincas en programas rutinarios de transferencia de embriones de manera fácil y efectiva e incluso en laboratorios de FIV.

Por otra parte este estudio constituye uno de los primeros aportes realizados en nuestro país en las investigaciones relacionadas con los procesos de crioprotección de embriones producidos *in vitro*, aportando nuestros modestos resultados para la comunidad científica.

**Objetivo general:**

Evaluar la eficiencia de las técnicas de conservación de embriones bovinos por vitrificación o por congelación con equipos programados, sobre la viabilidad post descongelación, utilizando embriones producidos *in vivo e in vitro*.

**Objetivos específicos:**

Evaluar la viabilidad post descongelación de los embriones de acuerdo con el método de criopreservación utilizado (ya sea congelación o vitrificación).

Evaluar la viabilidad post descongelación de los embriones según el modo de obtención de los mismos, *in vivo e in vitro*.

Evaluar la interacción entre los métodos de criopreservación y el modo de obtención de los embriones sobre la viabilidad post descongelación de los embriones.

## HIPÓTESIS

**Ho1:** no existe diferencia significativa en cuanto a eficiencia entre los métodos de vitrificación y de congelación sobre la preservación de embriones bovinos.

**Ho**  $T_i = T_j$

**Ha1:** existe diferencia significativa en cuanto a eficiencia entre los métodos de vitrificación y de congelación sobre la preservación de embriones bovinos.

**Ha**  $T_i \neq T_j$

**Ho2:** no existe diferencia significativa sobre la viabilidad de los embriones post descongelación al utilizar embriones producidos *in vivo e in vitro*.

**Ho**  $T_i = T_j$

**Ha2:** existe diferencia significativa sobre la viabilidad de los embriones post descongelación al utilizar embriones producidos *in vivo e in vitro*.

**Ha**  $T_i \neq T_j$

**Ho3:** no existe diferencia significativa sobre la viabilidad de los embriones post descongelación al evaluar la interacción de ambos factores (método de criopreservación y modo de obtención).

**Ha  $T_i \neq T_j$**

**Ha3:** existe diferencia significativa sobre la viabilidad de los embriones post descongelación al evaluar la interacción de ambos factores (método de criopreservación y modo de obtención)

**Ha  $T_i \neq T_j$**

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **1. CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES**

La congelación de una célula viviente constituye un proceso físico - químico complejo de supresión de calor y transporte de agua entre la célula y el medio externo. Existe una tasa de enfriamiento para cada tipo de célula, lo que depende de su talla y de su coeficiente de temperatura (De Armas, 2007).

Los embriones en estadio de preimplantación (día 6-8 de desarrollo), constituyen una entidad biológica fascinante, ya que contienen la información genética completa para el desarrollo del animal adulto (Lonergan, 1994; Kasai *et al.*, 2002). Pudiéndose conservar este conjunto celular por un tiempo indefinido a través del uso de técnicas especiales que involucran la congelación o la vitrificación para su posterior almacenamiento. Dichas técnicas se engloban con el término de criopreservación (Van Zutphen *et al.*, 1993).

#### **1.1 CONCEPTO DE CRIOPRESERVACION**

La criobiología constituye una rama de la biología cuyo objetivo principal es la conservación de células vivas mediante la utilización de bajas temperaturas, logrando detener los procesos de envejecimiento y degeneración celular (Vázquez *et al.*, 1998).

Según Wikipedia (2011), criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  (el punto de ebullición del nitrógeno líquido), para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por un largo periodo de tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas.

El tiempo que pueden permanecer viables los embriones criopreservados es aún incierto (Cabrera *et al*, 2009). Algunos autores como Gordon (1994) o Leibo y Songasen (2002), plantean como factible la idea ambiciosa de mantener viable embriones a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido durante quizás 1000 años o más.

Sin embargo, en reproducción asistida hay poca necesidad de pensar en la conservación que vaya más allá de algunos meses o años (Gordon, 1996).

## **2. ANTECEDENTES DE LA CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES**

En investigaciones del CIMA, (1988), se enuncia que los primeros intentos de criopreservar embriones animales se dieron en la segunda mitad de la década del 40 con estudios de Chang, conservando embriones de conejos a bajas temperaturas.

El siguiente intento se dio por estudios de Smith en 1952, que utilizando el glicerol, del que recientemente se había descubierto su acción protectora en criopreservación de espermatozoides, aplicó la técnica a embriones de conejo utilizando concentraciones de 15% de glicerol y conservándolos a temperaturas de -79 y -196 °C, logrando como resultado que los embriones mantuvieran su morfología y estructura pero sin efectividad a la hora de descongelarlos (CIMA, 1988).

Según Whittingham *et al.*, (1979), la primera criopreservación exitosa de embriones fue reportada en la especie murina en 1972. Se utilizó una tasa lenta de congelación de 0,3 a 2,0 °C/min y una tasa lenta de descongelación de 4 a 25 °C/min. Dependiendo de la tasa específica de congelación y descongelación usada, de 2500 embriones murinos congelados, un 50 a 70% se desarrollaron hasta el estadio de blastocito en cultivo *in vitro*, luego de su almacenamiento a una temperatura de -196 °C durante ocho días. De igual forma, se obtuvo un 65% de preñez y un 40% de nacimientos al ser transferidos a receptoras.

A partir de estos trabajos pioneros citados anteriormente, Prins *et al.*, (1984) realizaron la primera congelación exitosa de embriones de conejo en 1974. En los équidos, los trabajos fueron iniciados en 1981, obteniéndose un embrión implantado luego de ser criopreservado, pero fue abortado a los 60 días de gestación, lográndose un año después el primer nacimiento en esta especie, (Squires *et al.*, 1999).

Los primeros estudios realmente efectivos de congelación en bovinos se dieron a finales de la década del 70. Schneider *et al.*, (1980), obtuvo en embriones bovinos post descongelación hasta 70% de embriones con morfología normal y hasta un 30% de gestación al ser transferidos a novillas receptoras.

El proceso de vitrificación fue investigado por primera vez por Tammann en 1898 (Kuleshova, 2002). La publicación de un gran número de estudios de criopreservación rápida, condujo a la primera vitrificación exitosa de embriones mamíferos, haciendo uso de embriones murinos en estadio de desarrollo de ocho células utilizando una mezcla de crioprotectores compuesta por el dimetilsulfóxido, la acetamida, el propilenglicol y el polietilenglicol, denominando a esta técnica «criopreservación libre de hielo por vitrificación», (Rall *et al.*, 1985).

A partir de este logro científico, se presentaron reportes similares en distintas especies, como la primera vitrificación exitosa de embriones bovinos, la cual fue lograda usando como crioprotector una mezcla de glicerol y propanediol en altas concentraciones, (Massip *et al.*, 1987).

Según Kuleshova *et al.*, (2001) la relevancia de la vitrificación para la criopreservación de material biológico fue sugerida inicialmente por Luyet en 1937. Liebermann *et al.*, (2002) aseveraron que la cristalización es incompatible con los sistemas vivos y debe ser evitada siempre que sea posible. Asimismo, reseñaron que era posible la criopreservación de sistemas vivos pequeños a

velocidades muy altas de congelación, logrando eliminar la formación de hielo y crear en su lugar un estado vítreo o similar al vidrio.

Sin embargo, la vitrificación no fue aceptada completamente como una estrategia práctica para la criopreservación de embriones hasta muchos años después, cuando se catalogó como un método rápido y eficiente para la criopreservación de sistemas biológicos, (Zhu *et al.*, 1993).

Posteriormente, Yuswiati *et al.*, (1990) demostraron por primera vez la competencia biológica de embriones caprinos y ovinos a la criopreservación, a través de un método de vitrificación simple y rápido, ensayo replicado por Schiewe *et al.*, (1991), lográndose en ambos casos el nacimiento de crías viables.

La primera aplicación de la vitrificación en humanos fue realizada en 1998 por Mukaida *et al.*, (1998); y finalmente se logró la vitrificación de embriones equinos por Oberstein *et al.*, (2001).

### **3. IMPORTANCIA DE LA CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES**

La criopreservación de embriones representa un procedimiento básico en las técnicas de reproducción asistida en especies domésticas de interés económico, en especies silvestres y en animales de laboratorio (Kasai *et al.*, 2002).

En el caso de los bovinos, constituye una herramienta útil para la industria de la transferencia de embriones, ya que el número de embriones puede ser

fácilmente correlacionado con el número de receptoras disponibles en un momento apropiado del ciclo estral (Rall, 1992).

Desde el punto de vista práctico, la principal ventaja de la congelación de embriones es que permite economizar y aumentar el rendimiento del uso de receptoras, aspecto que significa la mayor inversión en la industria de la transferencia de embriones (Leibo, 1989).

También posibilita la transferencia de algunos embriones y la conservación del resto en bancos de germoplasma, hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia (Cabodevila y Teruel, 2001).

Según Palma (2008), la criopreservación permite a los ganaderos progresar genéticamente a bajo costo, comparando el valor de un embrión y su transporte con los de un animal en pie, lo cual también tiene implicación en la parte sanitaria ya que se garantiza que el embrión criopreservado importado llegue libre de cualquier enfermedad cuyo riesgo de introducción con un animal en pie es mucho mayor.

#### **4. PRINCIPIOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES**

La criopreservación tiene como finalidad mantener al embrión en un estado de animación suspendida, deteniendo o minimizando todos los procesos biológicos, incluyendo la actividad enzimática intercelular, la respiración celular, su metabolismo, además del crecimiento y multiplicación de la célula, logrando ser

reanimado después de un corto o largo período de tiempo (Rall, 1992; Gordon, 1994; Tanaka *et al.*, 1997), sin perder su capacidad de desarrollarse (Cabodevila y Teruel, 2001), y dar lugar al nacimiento de crías vivas.

Para que un líquido cristalice se requiere la presencia de "núcleos" sobre los cuales la fase líquida pueda condensarse. En el agua pura, grupos de moléculas unidas por puente de hidrógeno actúan como núcleos de cristalización (nucleación homogénea), aunque otras sustancias (proteínas, minerales, etc.) también pueden actuar como núcleos (nucleación heterogénea) (Zacchariassen *et al.*, 2000). De este modo, la formación de cristales se lleva a cabo mediante un proceso de "desarrollo" de núcleos, seguido por uno de agregación de moléculas de agua desde la fase líquida a la sólida en una zona de interfase, denominado "crecimiento" (Mucci *et al.*, 2005).

El proceso de congelación podría resumirse mencionando que a medida que una solución acuosa se enfría por debajo de 0° C, disminuye el movimiento molecular, sobre enfriándose hasta alcanzar una masa crítica de núcleos, momento en el cual se libera el calor latente de cambio de estado (Akyurt *et al.*, 2002). Uno de los efectos de la cristalización en las soluciones acuosas es remover agua de la solución, ya que los cristales que se forman están compuestos por agua pura, por lo cual la solución remanente, que permanece sobre enfriada, se concentra. De este modo, esta nueva solución permanece líquida hasta que se alcanza, mediante una mayor extracción de calor, el nuevo punto de equilibrio de congelamiento. Este proceso se repite hasta que a una

determinada temperatura, denominada eutéctica o "punto eutéctico", la fase líquida remanente y los solutos solidifican (Akyut, 2002; Vila y Carretero, 1985).

#### **4.1 CRIOPRESERVANTES**

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales de hielo que lesionan las estructuras citoplasmáticas, (Mazur, 1984). Esta deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación. En la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores: los intracelulares o permeables y los extracelulares o impermeables.

##### **4.1.1 INTRACELULARES O PERMEABLES.**

Entre los crioprotectores de bajo peso molecular tenemos: Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), poli etilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma, (Miyake *et al.*, 1993).

#### **4.1.2 EXTRACELULARES O IMPERMEABLES**

Son compuestos de alto peso molecular, como son la polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano, sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratando junto con el crioprotector intracelular las células de los embriones durante el equilibrio, (Sommerfeld *et al.*, 1999).

#### **4.2 FUNCIÓN DE LOS CRIOPRESERVANTES**

Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso. Además, no deben ser tóxicos ni afectar el metabolismo de los embriones. Como alternativas para reducir el daño osmótico y tóxico del crioprotector, debido a la alta concentración de sales, se dejó de utilizar glicerol y DMSO para hacer uso del etilenglicol, solo o en combinación con sucrosa o trealosa, lo que ha demostrado ser más eficiente (Dochi *et al.*, 1990; Leeuw *et al.*, 1994). Dado su bajo peso molecular, el etilenglicol posee una mayor velocidad de penetración y, por ende, necesita menor tiempo de exposición, disminuyendo su efecto tóxico (Saha *et al.*, 1996).

Leibo (1977), demostró que la permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa luego de la fecundación, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa. Esto se debería a la diferencia que existe en la relación área/volumen en un embrión en los primeros estadios del desarrollo.

### **4.3 METODOS DE CRIOPRESERVACIÓN**

Las estrategias desarrolladas para mejorar la sobrevivencia embrionaria post criopreservación han sido direccionadas en dos vías: En primer lugar, mediante la modificación del metabolismo del embrión, para así prevenir alteraciones celulares durante la criopreservación (Cabrera y Fernandez, 2006); en segundo lugar, se han utilizado principios físicos para desarrollar nuevos procedimientos de criopreservación (Hansen, 2006).

Sobre esta base Cabrera (2006), categoriza tres diferentes métodos de criopreservación dentro de los cuales también se hallan algunas variantes. Estos métodos son la refrigeración, la criopreservación previo equilibrio y la criopreservación no equilibrada.

#### **4.3.1 REFRIGERACIÓN**

La refrigeración es un método simple por medio del cual pueden mantenerse embriones a temperaturas entre 0 y 4 °C durante 24 a 72 horas (Gordon, 1994;

Cabodevila y Teruel, 2001). La refrigeración de embriones, se ubica como un paso intermedio entre la transferencia de embriones en fresco y conservados a -196 °C. Es un método utilizado cuando las receptoras se encuentran distantes de las donadoras, y también, para conservar embriones hasta que las receptoras asincrónicas alcancen la sincronización adecuada. Es una interesante herramienta considerando su simplicidad, logrando porcentajes de preñez que oscilan entre 44 y 50% en bovinos (Cabodevila y Teruel, 2001). Además, se ha reportado que la presencia de células apoptóticas es similar a la encontrada en embriones equinos frescos y almacenados durante 24 horas a 5 °C (Moussa *et al.*, 2004). Adicionalmente, Matsushita *et al.*, (2004) observaron que el almacenar los ovarios durante 24 horas a 10 °C, no afecta la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (68%) y su desarrollo a blastocito (25%), al compararlo con el control (68% y 27%, respectivamente).

#### **4.3.2 CRIOPRESERVACION CON EQUILIBRIO**

En la mayoría de los procedimientos de criopreservación de embriones que se llevan a cabo se hace uso de métodos tradicionales, es decir, métodos de equilibrio, empleando un enfriamiento lento, un calentamiento rápido y crioprotectores de permeabilidad relativamente baja (Palasz y Mapletoft, 1996). Cuando el embrión es expuesto a un crioprotector permeable, con una tasa de enfriamiento controlada, experimenta una primera contracción debido a una

pérdida osmótica de agua, para lograr un equilibrio entre la solución intra y extracelular (Vajta y Kuwayama, 2006).

Como el aditivo penetra al embrión, éste gradualmente se re expande a causa de la reentrada de agua para mantener el equilibrio osmótico. La tasa a la cual esta re expansión ocurre, depende de la especie del embrión, el estadio de desarrollo embrionario, la relación volumen-área de superficie del embrión, el crioprotector *per se* y la temperatura de exposición (Leibo, 1989). Cuando los embriones se suspenden en una solución de crioprotectores y son congelados por debajo de 0 °C, ocurren diversos cambios físicos, químicos y fisiológicos. A una temperatura usualmente por encima de -10°C, se forma hielo espontáneamente, siendo factible la inducción artificial de hielo, a través de un proceso denominado "seeding" (Cabodevila y Teruel, 2001). En consecuencia, la concentración de la solución extracelular se incrementa, tornándose los embriones impermeables a los crioprotectores a los cuales fueron libremente permeables a temperaturas por encima de 0°C. El incremento de las concentraciones de soluto, causa en el embrión una segunda contracción osmótica debido a la pérdida de agua (Leibo, 1989).

Como su nombre lo indica, estos métodos de criopreservación deben lograr un "equilibrio" entre la tasa a la cual el agua se pierde de la célula (deshidratación) y la tasa a la cual esa agua es incorporada a los cristales de hielo extracelular (Shaw y Jones, 2003; Vajta y Kuwayama, 2006). En resumen, el proceso se inicia al suspender los embriones en soluciones con concentraciones

relativamente bajas de agentes crioprotectores, aproximadamente 10% ó 1,5 M. Posteriormente, son cargados en pajuelas para su colocación en un congelador programable, donde se induce artificialmente la cristalización y se continúa el enfriamiento a tasas bajas de aproximadamente 0,5 a 2 °C /min (Niemann, 1991). Seguidamente, los embriones son sumergidos y almacenados en termos de nitrógeno líquido (-196 °C), para finalmente, cuando sea necesario utilizarlos, luego de su descongelación y remoción de los agentes crioprotectores, con el uso de azúcares (Leibo y Songsasen, 2002).

Los procedimientos de criopreservación equilibrada tienen tres variantes, la criopreservación lenta, la criopreservación en un paso y la criopreservación para transferencia directa (Cabodevila y Teruel, 2001).

#### **4.3.2.1 CONGELACIÓN LENTA**

Los crioprotectores utilizados en estos métodos son normalmente permeables. Los embriones son expuestos a soluciones conteniendo 10 a 11% (aproximadamente 1,5 M) de crioprotectores de bajo peso molecular, tales como el etilenglicol, el glicerol, el dimetilsulfóxido o el propilenglicol, hasta que se alcanza el equilibrio entre la solución crioprotectora y el embrión (Palasz y Mapletoft, 1996; Shaw et al., 2000).

De acuerdo a Rall (1993), la técnica se describe así:

Durante la fase inicial de pre enfriamiento, los embriones se exponen a la presencia del crioprotector en una fase que denominamos de equilibración. La respuesta inmediata del embrión ante la presencia de un criopreservante permeable es una rápida disminución de volumen por pérdida del agua intracelular, hasta que se alcanza el equilibrio. Este fenómeno se debe a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular y a que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores; la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del crioprotector. A medida que el crioprotector penetra en el embrión, éste se expande gradualmente a causa de una reentrada de agua para el mantenimiento del equilibrio osmótico. El momento en que se produce esta re expansión depende de:

- El estadio de desarrollo embrionario.
- El ratio superficie/volumen del embrión.
- El crioprotector utilizado.
- La temperatura de exposición.
- Tiempo de exposición.

La adición de crioprotectores en un solo paso, proporciona iguales tasas de sobrevivencia que la adición en pasos múltiples, además de acelerar y facilitar el proceso, lo cual es importante en condiciones de campo (Niemann, 1991; Zambrano, 2008).

Este paso produce cambios pasajeros de contracción y expansión del embrión a medida que el crioprotector penetra a la célula (Rall, 1992). De esta manera refleja su respuesta osmótica ante un ambiente hiperosmótico, considerando estos movimientos del embrión como indicadores de viabilidad (Niemann, 1991). Si bien cada crioprotector tiene mecanismos propios de acción, sus efectos generales son: estabilizar las membranas celulares, producir la salida de agua intracelular del embrión, reducir la concentración de electrolitos del medio extracelular y disminuir la temperatura a la cual ocurre la congelación intracelular (Gordon, 1994; Cabodevila y Teruel, 2001). Luego de envasar los embriones en pajuelas, éstas se colocan en congeladores programables, siendo el equipo más costoso en un programa de criopreservación (Gordon, 1994).

La respuesta celular a temperaturas por debajo de 0°C, depende de la tasa de enfriamiento a la cual son sometidas las células. Cuando se utilizan tasas de enfriamiento muy lentas, se produce lo que se conoce como efecto de solución, ya que al iniciarse el descenso de la temperatura, comienza a formarse hielo en la solución extracelular, con la consecuente concentración de sales. Los blastómeros ceden agua, produciéndose una deshidratación excesiva de las mismas, que ocasiona la disminución del volumen celular y la destrucción de la membrana plasmática (Cabodevila y Teruel, 2001).

Por el contrario, si la tasa de enfriamiento es rápida, el agua no alcanza a salir del interior de las células, produciéndose la formación de cristales de hielo en el espacio intracelular. Si la descongelación posterior es lenta, estos cristales

sufren un crecimiento adicional, provocando un daño mecánico que compromete la vida celular (Cabodevila y Teruel, 2001).

Las pajuelas son mantenidas a una temperatura de  $-5$  a  $-7^{\circ}\text{C}$ , durante aproximadamente cinco minutos (Palasz y Mapletoft, 1996). Cuando la temperatura alcanza los  $-10$  ó  $-15^{\circ}\text{C}$ , en la solución de congelación se forma hielo de manera espontánea, produciéndose un aumento brusco de temperatura denominado calor latente de fusión. Para evitar este fenómeno perjudicial para los embriones, se induce la formación artificial de cristales de hielo. Esta maniobra denominada "seeding" o siembra en español y se realiza entre  $-4$  y  $-7^{\circ}\text{C}$ , tocando la pajuela con una pinza enfriada previamente a  $-196^{\circ}\text{C}$  o de manera automática en algunos equipos programables (Cabodevila y Teruel, 2001). Con el crecimiento de cristales de hielo, el agua de la solución es convertida de un estado líquido a uno sólido y esto incrementa las concentraciones de soluto, lo cual atrae más agua al exterior de las células (Shaw *et al.*, 2000).

A medida que baja la temperatura, mayor cantidad de agua puede ser convertida en cristales de hielo, pero igualmente este descenso en la temperatura influye en un descenso en la salida de agua intracelular. Por consiguiente, el éxito de la criopreservación lenta depende del logro de un equilibrio óptimo entre la tasa a la cual el agua abandona la célula y la tasa a la cual ésta es convertida en cristales de hielo (Visintin *et al.*, 2002).

El descenso controlado de la temperatura continúa a una tasa de 0,2 a 2,0°C/min hasta no producir cambios de volumen en el embrión, ocurriendo esto entre - 30 y - 40 °C, momento en el cual son sumergidos en nitrógeno líquido a -196 °C (Palasz y Mapletoft, 1996; Cabodevila y Teruel, 2001).

La descongelación se realiza con velocidades de calentamiento aproximadas a los 250 °C/min. Luego se remueve el crioprotector a temperatura ambiente antes del cultivo o transferencia del embrión (Palasz y Mapletoft, 1996). Para que las blastómeros soporten (continúen viables) el proceso de congelación y descongelación, debe evitarse el daño de las mismas y deben permanecer fisiológicamente funcionales durante el proceso completo. Por lo tanto, cada paso es absolutamente crítico (Palasz y Mapletoft, 1996).

#### **4.3.2.2 CRIOPRESERVACION DE UN PASO**

De acuerdo a Cabodevila y Teruel (2001), para evitar que durante la extracción del crioprotector el embrión esté en contacto con el medio externo, Leibo en 1982 y Renard *et al.*, en el mismo año implementaron el denominado método de congelación de embriones en un paso o "one-step".

Este procedimiento se basa en el uso de un crioprotector no permeable, como la sucrosa, que permite la remoción de un crioprotector permeable, como el glicerol. Con esta técnica, se pueden transferir los embriones directamente a la hembra receptora sin la necesidad de una evaluación microscópica previa a la

transferencia y sin el repetido shock osmótico que sufren las células cuando se usa el método en etapas; de esta manera se simplifica el procedimiento de dilución o extracción del crioprotector (Palasz y Mapletoft, 1996).

No obstante, al prescindir de la evaluación morfológica post descongelación, es razonable esperar que los resultados de preñez sean inferiores (Cabodevila y Teruel, 2001). En este caso, los medios de congelación (1,5 M de glicerol) y dilución (0,5 a 1,0 M de sucrosa) son incluidos en la misma pajueta, pero separados por burbujas de aire. Después de la descongelación, la pajueta se agita con el fin de mezclar ambas soluciones y de esta forma el glicerol abandona el embrión como resultado del gradiente de concentración causado por la solución de sucrosa (Palasz y Mapletoft, 1996).

Como la sucrosa no es permeable, el embrión se contrae a medida que el agua y el glicerol salen de los blastómeros. El embrión eventualmente se rehidrata con los fluidos del útero de la hembra receptora una vez que ha sido transferido y alcanza nuevamente su volumen osmótico (Palasz y Mapletoft, 1996).

Esta técnica representa una gran ventaja práctica, dado que posibilita transferir embriones congelados de manera similar a lo que ocurre con la inseminación artificial (Cabodevila y Teruel, 2001). La tasa de preñez lograda con este método se aproxima a la que se alcanza con las técnicas tradicionales, pero los resultados son variables. Pareciera ser, que la causa principal de esta variabilidad se debe a la dificultad de mezclar ambas soluciones crioprotectoras dentro de la pajueta (Palasz y Mapletoft, 1996).

Cuando el glicerol es extraído, la viabilidad embrionaria puede ser afectada al no lograr una mezcla homogénea de las distintas soluciones (Cabodevila y Teruel, 2001), unido a una pérdida ocasional del embrión, porque éste se puede adherir al algodón que la pajuela tiene en uno de sus extremos. Además, se ha demostrado que las altas concentraciones de sucrosa causan daño al embrión cuando existen elevadas temperaturas (Palasz y Mapletoft, 1996).

#### **4.3.2.3 CRIOPRESERVACION CON TRANSFERENCIA DIRECTA**

De acuerdo a Cabrera y Fernandez (2006), una versión del método en un paso, es llamado método con transferencia directa, en el cual se emplean crioprotectores altamente permeables tales como el etilenglicol o el 1,2 propilenglicol.

En tal sentido, las pajuelas son descongeladas y el embrión es transferido directamente al útero de las receptoras. Como estos crioprotectores son altamente permeables, los embriones que son congelados y descongelados sufren un daño osmótico muy leve cuando son transferidos directamente a un ambiente isosmótico (útero). El uso de otros crioprotectores como el glicerol, con mayor peso molecular y tasa de permeabilidad lenta, estaría contraindicado ya que causaría un elevado shock osmótico (Cabodevila y Teruel, 2001).

Este método simplifica sustancialmente el procedimiento de la transferencia embrionaria, ya que permite la transferencia de los embriones directamente al

útero de las receptoras, sin extraerlos de la pajuela en la que fueron congelados. Además, reduce el tiempo requerido para realizar la técnica y disminuye los costos (Palasz y Mapletoft, 1996).

En cuanto a la tasa de preñez, ésta se acerca a la obtenida con los métodos tradicionales en los cuales se remueve el crioprotector antes de la transferencia (Palasz y Mapletoft, 1996; Zambrano, 2008).

#### **4.3.3 CRIOPRESERVACION NO EQUILIBRADA**

El término no equilibrada, se usa para describir la criopreservación por procedimientos en los cuales las células y los tejidos no están en equilibrio con las altas concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables, antes de un enfriamiento rápido (Cabrera y Fernandez, 2006). Las altas concentraciones de crioprotectores causan una rápida deshidratación de las células y el enfriamiento ocurre antes del equilibrio osmótico entre el medio y el embrión (Vajta y Kuwayama, 2006).

Los procedimientos de criopreservación no equilibrada, difieren de los procedimientos equilibrados en el logro de una mayor deshidratación y penetración de los crioprotectores previo al inicio del enfriamiento, logrando este enfriamiento en un solo paso (Shaw y Jones, 2003).

En resumen, las células son suspendidas muy brevemente en soluciones con altas concentraciones de una mezcla de agentes crioprotectores,

aproximadamente más del 40% ó 6 a 8 M, y enfriadas a tasas altas, mayores a 500 °C/min (Leibo y Songsasen, 2002). Los procedimientos no equilibrados de criopreservación poseen dos variantes: la criopreservación ultrarrápida y la vitrificación, dependiendo si forma o no hielo en la solución durante la criopreservación (Shaw *et al.*, 2000).

#### **4.3.3.1 CRIOPRESERVACION ULTRARRAPIDA**

Esta técnica fue desarrollada por Takeda *et al.*, (1984), y su principal característica que la diferencia de la vitrificación es que en ella se da la formación de cristales de hielo tanto intra como extracelular al momento de la criopreservación.

Este método es usado para describir la criopreservación de células que han sido parcialmente deshidratadas antes de ser sometidas a una tasa de enfriamiento rápido de 1250°C/min. Un prerequisite fundamental para criopreservar embriones exitosamente por este método, es usar una solución compuesta de una mezcla de 2 a 4,5 M de crioprotectores permeables, tales como el glicerol, el propanediol, el dimetilsulfóxido o el etilenglicol, y 0,25 a 0,5 M de crioprotectores no permeables tales como la sucrosa, la trealosa, la lactosa o la galactosa (Gordon, 1994).

Después de un período de equilibrio (30 segundos a 3 minutos), los embriones en un estado parcialmente deshidratado son enfriados en temperaturas

intermedias de  $-21^{\circ}\text{C}$  durante 35 minutos antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido (Cabodevila y Teruel, 2001).

En contraste con la vitrificación, el agua extracelular se congela y la osmolaridad de la solución de congelación aumenta, causando mayor pérdida de agua desde los blastómeros del embrión. La criopreservación de embriones bovinos por esta técnica ha proporcionado tasas de supervivencia bajas (33,3%), si se compara con los métodos convencionales de congelación lenta o de vitrificación (Palasz y Mapletoft, 1996).

#### **4.3.3.2 VITRIFICACIÓN**

La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en una solución altamente concentrada de crioprotectores, solidificándose durante el enfriamiento sin la formación de cristales de hielo, (Vajta *et al.*, 2006).

Los factores que afectan la probabilidad de vitrificación de una solución son la viscosidad inicial, su volumen y la tasa de enfriamiento a la cual es sometida (Arav *et al.*, 2002). Según Wolfe y Bryant (1999), la adición de distintos solutos disminuye la probabilidad de nucleación y crecimiento de los cristales de hielo por dos razones:

1. Al aumentar la viscosidad, se retrasa el reordenamiento de las moléculas de agua para formar el cristal de hielo, dificultándose de este modo los procesos de nucleación y crecimiento.
2. Debido a que los solutos son incompatibles con la estructura del hielo, por carecer de una cantidad determinada de agua pura, se torna difícil que los núcleos alcancen el tamaño crítico.

Durante el proceso de vitrificación, el rápido enfriamiento disminuye bruscamente el movimiento molecular, de modo que las moléculas de agua no tienen el tiempo suficiente para ordenarse y orientarse, de acuerdo a sus cargas, para formar los cristales de hielo. Por esta razón las soluciones vitrificadas mantienen la distribución iónica y molecular de un líquido pero en un estado sobre enfriado y extremadamente viscoso, con un aspecto brillante y transparente que lo diferencia del cristalino el cual es opaco y sin brillo

.Tanaka *et al.*, (1997) y Shaw *et al.*, (2000) aseveran que en condiciones prácticas, esto se logra mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido, representando una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2500°C/min, demorándose así pocos segundos en criopreservarse. La solución no se cristaliza, se vitrifica, es decir, aumenta abruptamente su viscosidad y se transforma a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, por el cual el método toma su denominación. De esta manera, se conserva la distribución normal tanto molecular como iónica del estado líquido.

La vitrificación se evidencia por la formación de una estructura sólida de apariencia clara, la cual es transformada durante el calentamiento a un estado líquido, sin la presencia de una apariencia lechosa, la cual podemos observarla en los procesos de cristalización o formación de hielo, (Silva *et al.*, 2004).

Las células sufren una deshidratación osmótica previa al enfriamiento, por una equilibración en una solución altamente concentrada de crioprotectores. Ello determina una serie de cambios en el volumen osmótico de los embriones durante el proceso de crio conservación, sin que se produzca la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento, almacenamiento o descongelación, (Diez, 2003).

Las soluciones de vitrificación pueden contener DMSO, propilenglicol, etilenglicol, incluso glicerol, solos o en combinación, y en concentraciones muy elevadas.

El uso de esta técnica tiene los inconvenientes derivados de los posibles efectos tóxicos de la utilización de los crioprotectores en concentraciones muy altas, que en la actualidad están controlados. Además, no permite la transferencia directa del embrión a la receptora (requiere manipulación), lo que supone una dificultad para su aplicación en el campo.

La vitrificación produce fenómenos de degeneración celular en el embrión con relación a embriones no vitrificados, pero que no parecen afectar a los índices de gestación con relación a un sistema clásico de congelación lenta, (Van Langendonck *et al.*, 1995).

#### **4.3.3.2.1 MÉTODO OPEN PULLED STRAW (OPS) (Vajta *et al*, 1998; Vajta, 2000)**

Este método es una variante del sistema de vitrificación. La mayor parte de los métodos de vitrificación utilizan pajuelas "mini" francesas (0,25 ml) que, debido a sus dimensiones, no permiten alcanzar velocidades de enfriamiento y calentamiento que sobrepasen los 2000°C/min. Teniendo en cuenta que la relación volumen/superficie en contacto con el crioprotector es uno de los factores que más influencia tiene sobre las tasas de supervivencia pos descongelación, este sistema ofrece la posibilidad de disminuir los efectos perjudiciales de las soluciones crioprotectoras. Para ello, utilizan velocidades de enfriamiento y calentamiento superiores a los 2000°C/min, y tiempos de contacto con la solución crioprotectora inferiores a los 30 segundos (a una temperatura de -180°C) (Diez, 2003).

De una forma muy esquemática, el procedimiento de trabajo se basa en la utilización de unas pajuelas especiales cuyo diámetro ha sido reducido hasta 0,8 mm (el diámetro inicial de una pajuela clásica es de 1,7 mm), y el grosor de las paredes a 0,07 mm (grosor inicial 0,15 mm). Estos cambios en las características de las pajuelas permitirán un mayor contacto entre las células y la fuente de frío, con lo que las velocidades de enfriamiento se incrementan notablemente.

Los embriones previamente dispuestos en microgotas conteniendo la solución crioprotectora, entran en la pajuela haciendo contactar ésta con la micro gota, por un fenómeno de capilaridad. Inmediatamente después, se pueden sumergir la pajuela en nitrógeno líquido.

Para el proceso de descongelación, bastará con sumergir la pajuela en el medio de descongelación elegido. Una vez descongelado el contenido de la misma, los embriones saldrán de la pajuela también por capilaridad.

Según Diez (2003), las ventajas que ofrece el sistema OPS son:

- ◆ Altas velocidades de enfriamiento y calentamiento. Los cambios de temperatura en este sistema son hasta 10 veces más rápidos que en el sistema clásico de vitrificación, con pajuelas estándar. Las razones para que se produzca este hecho son:
  - El reducido volumen de solución que tiene cabida en las pajuelas OPS (0,5 ml vs 5 ml en las pajuelas normales).
  - El contacto directo entre la fuente de frío o de calor.
  - La delgadez de la pared de las pajuelas OPS.
- ◆ Rápido y fácil cargado de los embriones en las pajuelas.
- ◆ Menos riesgo de lesiones de la zona pelúcida, fenómeno muy corriente cuando los embriones son enfriados o calentados muy rápidamente
- ◆ Dilución inmediata de los agentes crioprotectores durante el proceso de calentamiento.

El único inconveniente de esta técnica es la posibilidad de contaminación, al contactar el medio de mantenimiento que contiene el embrión directamente con el nitrógeno líquido. Este problema puede solventarse utilizando nitrógeno líquido filtrado para el proceso de enfriamiento de la pajueta (Diez, 2003).

A pesar de las importantes diferencias existentes entre ambos tipos de métodos cabe subrayar que, básicamente, los objetivos perseguidos son, a grandes rasgos, los mismos: deshidratación de las células previa al almacenamiento en nitrógeno líquido, y prevención de los posibles efectos deletéreos, de la toxicidad química y de la congelación intracelular. Un método ideal de criopreservación requiere la optimización de cada uno de los pasos del procedimiento, teniendo en cuenta el tamaño, la permeabilidad y las características fisiológicas de los constituyentes celulares, que nos determinarán la adición del crioprotector, la curva de enfriamiento, la inducción de la formación de hielo, el proceso de congelación y el almacenamiento del embrión, así como el método de descongelación y la eliminación del crioprotector adecuados (Van Langendonck et al, 1995).

#### **4.4 FACTORES QUE LIMITAN LA EFECTIVIDAD DE LA CRIOPRESERVACION**

Durante el procesamiento y enfriamiento de los embriones, o durante la recuperación de los mismos luego de la descongelación, existen riesgos de

daños por varios factores que incluyen: 1) toxicidad de crioprotectores; 2) lesión por el “superenfriamiento”; 3) daños físicos a la membrana por cristales extracelulares formados durante el enfriamiento; 4) toxicidad por la concentración de electrolitos; 5) formación y crecimiento de cristales intracelulares lesivos para la membrana u organelas citoplasmáticas; 6) fracturas celulares; 7) lisis por las diferencias en la osmolaridad dentro y fuera de la célula (Lonagan, 1994).

De acuerdo a Mucci (2005) las crioinjurias o daños a los que se ve expuesto el embrión durante el proceso de criopreservación podrían deberse a:

- **Formación de hielo intra o extracelular.** Durante el proceso de criopreservación, la formación de hielo intracelular puede deberse a tasas de descenso térmico muy altas. Por ello el agua intracelular no tiene tiempo suficiente para alcanzar el medio extracelular, se sobre enfría, alcanza la temperatura de nucleación y finalmente se cristaliza dentro del citoplasma. Por otra parte, si la tasa de ascenso térmico durante la descongelación o calentamiento no es lo suficientemente rápida, es posible que se produzca hielo intracelular como consecuencia de un nuevo pasaje a través de la temperatura de nucleación, o por crecimiento de los pequeños cristales que pudieran haberse generado durante el enfriamiento. Esto puede producirse además, por un desequilibrio entre la concentración del crioprotector y la tasa de descenso térmico (Kasay *et al*, 2002).

Acker y McGann (1998) concluyeron que la propagación de cristales de hielo entre células adyacentes se establece mediante un proceso denominado "nucleación catalizada por superficie". Esto contrasta con la teoría de Berger y Uhrik (1996) e Irimia y Karisson (2002), quienes sostienen que el hielo intracelular se propaga a través de uniones intercelulares tipo gap. Sin embargo, otros autores sostienen que durante la criopreservación se generarían fuerzas suficientes como para producir pequeñas lesiones en la membrana plasmática por donde se propagaría el hielo (Muldrew y McGann, 1994).

Actualmente, la utilización de modernas máquinas congeladoras programables y la combinación de distintos crioprotectores, determinan que sea poco habitual la lesión embrionaria por hielo extracelular. Con el fin de caracterizar la apariencia morfológica de los embriones afectados por este tipo de injuria, Kasai *et al.*, (2002) lograron reproducir este proceso colocando embriones de ratón a  $-3^{\circ}\text{C}$  y descendiendo la temperatura a  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  hasta  $-15^{\circ}\text{C}$ , en ausencia de crioprotector. Cuando los embriones fueron colocados en PBS, observaron deformación de la zona pelúcida y un marcado aumento del tamaño de las células embrionarias.

- **Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico.** La adición o extracción de las sustancias crioprotectoras, así como el propio proceso de congelación (efecto de solución),

producen cambios de volumen en las células embrionarias que, dependiendo de su magnitud, pueden afectar su sobrevivencia postcriopreservación. La disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua puede determinar modificaciones en la composición del medio intracitoplásmico (Karow, 2001). En este caso, los solutos altamente concentrados podrían precipitar o afectar la conformación proteica y consecuentemente su función metabólica. Por otro lado, la deshidratación favorecería la pérdida de ubicación normal de las estructuras citoplásmicas, aproximándose lo suficiente como para permitir reacciones intermoleculares como uniones entre grupos sulfhídricos libres de tipo irreversible.

Con respecto al aumento excesivo de volumen, pareciera ser crítico el manejo de los embriones inmediatamente después de la descongelación o el calentamiento. La alta concentración de crioprotectores intracelulares puede determinar que las células embrionarias incorporen agua y aumenten excesivamente de volumen, pudiendo dañar estructuras internas o bien desintegrarse por completo (Mucci, 2005).

- **Efecto tóxico del crioprotector.** El cito esqueleto constituye una compleja red de filamentos proteicos, extendidos a través del citoplasma, que coordinan la organización y el movimiento intracitoplásmico (Dobrinsky, 1996). Sin embargo, los elementos que lo

constituyen presentan un comportamiento inestable, en donde las subunidades que lo componen se encuentran en constante recambio (Bretscher, 2000). Aunque los crioprotectores son necesarios para minimizar los daños que puedan ocurrir durante la criopreservación, según Dobrinsky (1996) estos compuestos pueden también tener efectos nocivos sobre los embriones por toxicidad química. Este autor sostiene que el daño se produciría por una alteración en la organización de los filamentos que componen el citoesqueleto, que culminaría con una despolimerización de los mismos.

Otras alteraciones asociadas con la adición de sustancias crioprotectoras son el aumento del espacio perivitelino, el aumento de tamaño mitocondrial y la presencia de vacuolas dentro de las mismas, así como la aparición de signos de degeneración nuclear (Fair *et al.*, 2001). Además, el glicerol podría inhibir el sistema  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ , el cual es fundamental para el mantenimiento del gradiente osmótico celular (Barnet, 1978).

- **Alteraciones de las membranas celulares.** Las membranas celulares (plasmática y de organelas) son adversamente afectadas por efecto osmótico durante los procesos de criopreservación y su lesión constituye uno de los indicadores más importantes de muerte celular (Gardner, 1999; Karow, 2001; Wolfe *et al.*, 1999). Cuando el contenido de agua intracelular disminuye por debajo de 10-20%, los

componentes celulares permanecen muy juntos entre sí, pudiendo determinar que las membranas pasen de un estado gel de tipo laminar, a uno hexagonal de fase II (Wolfe, 1999), aunque este proceso también puede producirse por efecto directo del frío (Petit *et al.*, 1974). En este estado, formado por pequeños cilindros de agua rodeados por fosfolípidos, las membranas celulares pierden la capacidad para llevar a cabo la mayoría de sus funciones. Otra causa por la cual las membranas pueden ser dañadas la constituye la formación de hielo intracelular (Acker y McGann, 2001).

- **Fractura embrionaria o de la zona pelúcida.** Este tipo de lesiones, probablemente se produzcan debido a diferencias en la expansión de los cristales de hielo (Lehn-tensen *et al.*, 1981), lo cual generaría cambios irregulares de volumen en los medios de criopreservación durante un rápido cambio de fase (Rall *et al.*, 1989). Según Kasai *et al.*, (1990) durante la congelación convencional más del 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si las tasas de descenso-ascenso térmico durante la congelación-descongelación no son adecuadamente ajustadas. La utilización de elementos flexibles (pajuelas plásticas) para contener los embriones durante la criopreservación permite amortiguar los cambios de volumen de la solución. Durante la vitrificación-calentamiento, al no producirse cambios de fase, la incidencia de este tipo de crio injuria es menor

(Kasay, 1996). Esta lesión es más frecuente durante el calentamiento, y se produciría por el rápido pasaje a través de la temperatura en la cual se forma la fase vítrea (-110 a -135°C) (Mucci *et al.*, 2005).

**CUADRO I. SUSCEPTIBILIDAD A CRIOINJURIAS EMBRIONARIAS DE ACUERDO AL MÉTODO DE CRIOPRESERVACIÓN UTILIZADO.**

<b>Crioinjurias</b>	<b>Congelación convencional</b>	<b>Vitrificación</b>
<b>Formación de hielo intra/extra celular</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>
<b>Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
<b>Efecto tóxico del crioprotector</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>
<b>Alteración de la membrana plasmática</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Fractura embrionaria o de la zona pelúcida</b>	<b>++</b>	<b>+</b>

FUENTE: Mucci *et al.*, (2005)

- **Otras crioinjurias.** Morris (2000) menciona que durante la congelación, los embriones rara vez toman contacto directo con los

cristales de hielo, permaneciendo en la fracción no congelada, donde son expuestos a diversos tipos de estrés físico, tales como: Daño mecánico como consecuencia de la formación de burbujas debido a un aumento de gas soluble; Alteración en los procesos de difusión y osmosis, producto de un aumento de la viscosidad; Desnaturalización proteica, debido a cambios de pH.

#### **4.4.1 DIFERENCIA EN LA SUCEPTIBILIDAD A CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES OBTENIDOS IN VIVO E IN VITRO**

La producción de embriones *in vitro* a partir de ovocitos obtenidos de vacas de alto mérito es una herramienta que ofrece nuevas perspectivas para la aceleración del progreso genético (Diez, 2003).

El primer ternero resultado del trasplante de un embrión *in vitro*, congelado/descongelado nació en 1990 (Fukuda *et al*, 1990). Desde entonces han sido muchos los protocolos de congelación ensayados, pero su eficacia está corrientemente evaluada en términos de supervivencia tras descongelación y cultivo *in vitro*. Sólo unos pocos estudios ofrecen datos de porcentajes de gestación tras transferencia de uno o dos embriones en un número significativo de receptoras (Diez, 2003).

Desde el inicio de la aplicación de la tecnología *in vitro*, se han desarrollado numerosos sistemas de cultivo capaces de llevar a buen término la producción

de embriones bovinos. Estos sistemas se clasifican en función de su composición, de la presencia de células en el medio de cultivo, como soporte del desarrollo embrionario. Las formulaciones de estos medios derivan de estudios realizados sobre la composición bioquímica de los medios tubárico y uterino, así como del análisis de las necesidades metabólicas del embrión (Diez, 2003).

El medio ambiente en el que se desarrolla el embrión *in vitro* difiere sustancialmente del que existe en condiciones *in vivo* tal como se puede observar en el cuadro 2. Durante su desarrollo *in vitro* los embriones se ven expuestos a choques térmicos, fuentes luminosas, atmósfera gaseosa (5% de CO<sub>2</sub> en aire) y a unas condiciones de cultivo estáticas caracterizadas por una importante cantidad de medio rodeando al embrión que puede aportar un exceso, o bien carecer de los nutrientes necesarios (Massip et al, 1995).

#### CUADRO II. COMPARACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DESARROLLO IN VIVO E IN VITRO DE LOS EMBRIONES BOVINOS

IN VIVO	IN VITRO
Temperatura corporal constante	Choques térmicos
Oscuridad total	Exposición a luz diurna y del microscopio
Presiones de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> controladas	Exposición directa a la atmósfera gaseosa
Volumen mínimo de secreciones genitales rodeando al embrión	Volumen importante de medio de cultivo rodeando al embrión
Intercambios dinámicos permanentes entre el embrión y el medio	Condiciones de cultivo estáticas, presencia excesiva o ausencia de algunos metabolitos

Fuente: Massip et al (1995), adaptado por Diez (2003)

Estas condiciones de cultivo, podrían inducir diferencias fundamentales tanto desde un punto de vista morfológico como fisiológico que determinan que el comportamiento frente al frío de los embriones producidos *in vitro* sea diferente al de los embriones obtenidos *in vivo*.

El embrión se desarrolla y diferencia en el tiempo según una cronología bien caracterizada en la especie bovina. La fecundación marca el inicio del periodo embrionario caracterizado por una serie de divisiones celulares y la aparición de las primeras diferenciaciones. En los bovinos la primera división de segmentación tiene lugar entre 11 y 20 horas tras la fecundación, alcanzándose el estadio de 8 células entre 56 y 64 h después. A partir de la fase de 16-32 células (80-86 h post-FIV), se establecen contactos entre los blastómeros y se estrechan las uniones entre las membranas plasmáticas de forma que las células no son visibles de forma individual: es el estadio de mórula compacta (Diez, 2003).

Cuando el embrión tiene entre 80 y 100 células (130-144 horas post-FIV) comienza a acumularse líquido en el interior de la mórula, inicialmente en la parte basal de las células externas y después fuera de las células dando lugar a la formación de una cavidad: el blastocele. Este estadio representa el momento del desarrollo en el que se diferencian dos tipos diferentes de células: las células del trofoectodermo, en la superficie del embrión y con naturaleza epitelial (darán origen a las envolturas fetales) y las células de la masa celular interna en la parte interior, que darán lugar al feto (Diez, 2003).

Un estudio comparado de la cronología del desarrollo embrionario *in vitro* de embriones madurados y fecundados *in vivo* evidenció diferencias morfológicas. Los embriones fecundados *in vivo* tienen, en la fase de una célula, un espacio perivitelino importante; en el estadio de 8 células, los blastómeros son de forma y tamaño regulares; las mórulas se compactan de forma sincrónica y las células de los blastocitos están bien definidas. En el caso de embriones producidos *in vitro*, el espacio perivitelino en fase de una célula es muy limitado; en estadio de 8 células los blastómeros son irregulares en su forma y tamaño; la compactación de las mórulas es mucho menos pronunciada (en ocasiones no es apreciable), y las células de los blastocitos aparecen oscuras y difuminadas (Greve *et al.*, 1993; Holm *et al.*, 1998).

Los embriones cultivados *in vitro* tienen un aspecto más oscuro y el citoplasma está sembrado de gran cantidad de inclusiones lipídicas, cuyo número varía en función de las condiciones de cultivo. Estas son muy numerosas cuando se suplementa el medio con suero, y son menos abundantes en el citoplasma de embriones cultivados en medios suplementados únicamente con BSA y aminoácidos (Dorland *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1994).

Otro estudio encontró que los embriones producidos *in vitro* se dividen más lentamente y de una forma más asincrónica: 72 horas post-FIV, sólo un 27% de los embriones alcanzó el estadio de 8 células contra un 46% para los embriones *in vivo* (Guyader-Joly, 1997).

Por último, los embriones que sufren la segmentación más rápidamente tienen una capacidad de desarrollo superior en términos de formación de mórula-blastocito, ya que el 35% de los embriones producidos *in vitro* alcanza este estadio 7 días tras la inseminación, mientras que la cifra se eleva a un 69% para el caso de los embriones *in vivo*.

La viabilidad de los embriones cultivados *in vitro* tras crioconservación está correlacionada con su cinética de desarrollo. En este sentido se ha encontrado que aquellos embriones que sufren su primera segmentación 26 a 36 h post FIV, alcanzan el estado blastocito más rápidamente que los que se segmentan de forma más tardía (36-48 h). Estos blastocitos desarrollados tras 6-7 días de cultivo *in vitro* son menos sensibles a la congelación que los que necesitan ser cultivados durante más tiempo para alcanzar dicho estadio (Leibo *et al.*, 1996).

La microscopía electrónica permite la observación de diferencias entre los embriones producidos *in vivo* en *in vitro*, en idénticos estadios de desarrollo, y entre embriones producidos *in vitro* en función del medio de cultivo. Los blastómeros de los embriones producidos *in vitro* tienen un número más elevado de vacuolas citoplasmáticas y fagosomas. Las uniones "gap" entre células son más cortas y menos numerosas (Greve *et al.*, 1993).

Leibo *et al.*, (1993) demostraron que la densidad de los embriones producidos *in vitro* es menor que la de los *in vivo*, probablemente debido a una mayor tasa de lípidos/proteínas en el primero de los casos. Aunque el papel que puedan desempeñar dichos lípidos no ha sido dilucidado, diversos equipos han

demostrado una mejora significativa de la congelabilidad de los blastocitos obtenidos tras el cultivo de cigotos sometidos a delipidación o desplazamiento de dichos lípidos citoplasmáticos (Diez *et al.*, 2001; Leibo *et al.*, 1995).

Las microgotas citoplasmáticas de lípidos tienen una fuerte relación espacial con el retículo endoplásmico liso y desempeñan un papel muy importante como fuente de elementos nutritivos, pero también modificando las propiedades físicas y las funciones de las membranas. La presencia de estas microgotas podría tener, por sí misma, un efecto directo sobre la supervivencia durante el enfriamiento (Guyader-Joly, 1998).

Se sabe que el enfriamiento hasta 15°C produce una tendencia a la agregación de las microgotas, para formar gotas intracitoplasmáticas más grandes. Ello podría provocar una pérdida de la organización del citoplasma y una lesión irreversible del embrión (Diez, 2003).

Por último, cabe citar el hecho de que la zona pelúcida de los embriones producidos *in vitro* se comporta de forma diferente en presencia de la enzima pronasa, comparada con los embriones *in vivo*: es más sensible a la acción de la enzima disolviéndose en menos de dos minutos (más de tres en el caso de los *in vivo*) (Leibo *et al.*, 1996). No obstante este hecho, parece que la zona pelúcida actúa como una barrera más resistente a la eclosión que la de los embriones *in vivo*.

Se ha descrito que los embriones producidos *in vitro* son más susceptibles a los procesos de enfriamiento y calentamiento que los producidos *in vivo*, al parecer,

como un resultado de sus variaciones y diferencias morfológicas y bioquímicas, entre ellas, la estructura de la zona pelúcida, la cual es más fácilmente digerida por métodos enzimáticos pero más resistente a la eclosión en los embriones *in vitro* (Massip *et al.*, 1995), el grado de compactación de la mórula (Hochi *et al.*, 1996; Vajta *et al.*, 1996), el pobre contacto intercelular (Vajta *et al.*, 1997), el incremento del contenido lipídico intracelular (Massip *et al.*, 1995; Mazur *et al.*, 1980) y el tamaño y número de células de la masa celular interna (Vajta, 2000), diferencias que se han atribuido al medio ambiente inapropiado de la maduración de los ovocitos y al sistema de cultivo embrionario utilizado (Massip *et al.*, 1995; Vajta, 2000).

#### **4.5 MÉTODOS DE DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES**

Los embriones criopreservados deben ser descongelados tras su almacenamiento como paso previo a su transferencia. A diferencia de la congelación la cual es hecha a bajas velocidades la descongelación es a altas velocidades, para tratar de disminuir los daños que puedan ocasionar el hielo intracelular existente en el embrión (Zambrano, 2008).

La tasa de calentamiento óptima para la descongelación está determinada por el número y el tamaño de los cristales de hielo que se formaron en la congelación, la tasa de enfriamiento tras la siembra y la temperatura de inmersión. Si quedó agua en el interior de las células cuando se indujo la siembra, y éstas son

descongeladas lentamente, tendría lugar el fenómeno de la "recristalización". En este caso, los cristales de hielo intracelulares formados en el proceso de congelación crecerían excesivamente durante el recalentamiento y dañarían las células (Willadsen *et al.*, 1978).

En cambio, si se llevó a cabo un enfriamiento lento, hasta bajas temperaturas de inmersión, las células estarán muy deshidratadas y un descongelamiento lento es necesario (Whittingham, 1972; Wilmut, 1972).

Rall y Polge (1984), indicaron que un descongelamiento lento otorga el tiempo suficiente como para permitir la desvitrificación extra e intracitoplásmica lo que puede conducir a una baja sobrevida post criopreservación.

Reseña Zambrano (2008), que teniendo en cuenta que la vitrificación es un proceso físico diferente al de la congelación, es necesario definir con claridad, el significado de la terminología usada al hacer referencia al tema.

Cuando se habla de llevar nuevamente el material biológico vitrificado a la temperatura ambiente de laboratorio se utiliza el término "calentar" y no "descongelar". Por otra parte, "desvitrificación" no significa, como parecería, salir del estado de vitrificación para regresar a la temperatura óptima celular o corporal, sino que indica pérdida del estado vítreo pasando al de cristalización, hecho indeseable que puede ser incompatible con la viabilidad celular y/o embrionaria (Capdevielle, 1996).

#### 4.5.1 TEMPERATURA DE DESCONGELACION

La temperatura a la que se detiene la congelación lenta y a la cual los embriones son inmersos en el nitrógeno líquido determina la velocidad de descongelación que será necesaria aplicar (Zambrano, 2008).

Cuando se la detiene a -30 ó -40 grados centígrados, es posible realizar la descongelación de manera rápida sumergiendo los embriones en un baño María entre 20 a 37 grados centígrados durante 20-30 segundos. Si el enfriamiento lento se extiende hasta -70 grados centígrados, la descongelación debe efectuarse lentamente, Palma (2008).

Una de las primeras modificaciones a un protocolo original fue introducida por Willadsen (1977), donde descongelaba de manera rápida colocándolos en un baño María a 25<sup>0</sup>C durante 20 segundos.

El agua vitrificada mantiene la misma distribución iónica y molecular que en estado líquido, por lo cual, si al calentar la muestra el movimiento molecular no se recupera rápidamente, existe el riesgo de que se establezcan los procesos de nucleación homogénea o heterogénea, así como el de crecimiento a partir de pequeños núcleos formados durante la vitrificación, Wowk (2000).

Por este motivo, durante el calentamiento, se necesita alcanzar altas tasas de ascenso térmico. Rall y Fahy (1985) observaron que los mayores porcentajes de sobrevida embrionaria se obtuvieron cuando el calentamiento se efectuó de modo rápido (2500<sup>0</sup>C/minuto).

En la práctica, estas tasas se logran introduciendo la pajuela en un baño María a 20 grados centígrados (Ishimori *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1994) o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39 grados centígrados durante pocos segundos, (Leoni 2002; Mtango 2001).

Vajta (2000) con el método Open Pull Straw asevera que las tasas de descongelación que se dan en este método pueden llegar a los 20000<sup>0</sup>C/minuto, lo cual favorece la posterior salida del crioprotector sin daños embrionarios por shock térmico, aseverando el autor que esta es una de las mayores ventajas de esta técnica.

#### **4.5.2 EXTRACCIÓN DEL CRIOPROTECTOR**

La mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones luego de la descongelación y antes de ser transferidos a hembras receptoras o colocados en cultivo. Esto debe efectuarse porque al momento de la descongelación, las células cargadas de crioprotectores son expuestas a una solución de PBS isosmolar respecto de las células en condiciones normales o al tracto reproductor femenino, debido a que el agua difunde más rápido que estos compuestos a través de la membrana plasmática y en este caso, las células se desintegrarían por el shock osmótico (Mucci *et al.*, 2001).

De igual manera en la vitrificación una vez calentadas las pajuelas, los crioprotectores penetrantes deben ser retirados de los embriones, e

inmediatamente, éstos deben rehidratarse por similares razones descritas, (Zambrano, 2008).

Los embriones pueden ser descongelados en diferentes soluciones en dependencia del crioprotector empleado, (de Armas *et al.*, 1995).

Uno de los métodos utilizados para la remoción del crioprotector es la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crioprotector utilizado (Zambrano, 2008).

Otra alternativa es emplear sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante, (Mucci *et al.*, 2001)

En 1984, Leibo desarrolló el método One-Step en el cual la extracción del crioprotector (Glicerol 1,5 M) se efectúa dentro de la misma pajueta de transferencia. En esta se carga una columna de sacarosa iso-osmolar al medio de congelación y luego de la descongelación, la pajueta se agita para que se mezclen las soluciones, se mantiene la misma durante 5-20 minutos a 20-37 grados centígrados, y se efectúa la transferencia.

Una variante a este sistema fue la desarrollada por Massip y Van der Zwalmen (1984) quienes obtuvieron buenos resultados cuando los embriones fueron equilibrados y congelados en una mezcla de glicerol (Gl) 1,36 M + sacarosa 0,25 M en PBS y una vez descongelados fueron transferidos directamente a las hembras receptoras sin necesidad de remover los crioprotectores.

Posteriormente Voelkel y Hu (1992), obtuvieron resultados similares reemplazando el GI por el etilenglicol (EG) (crioprotector penetrante de muy bajo peso molecular que difunde a través de la membrana plasmática rápidamente). En esta metodología la remoción del crioprotector se efectúa en el ambiente uterino, posibilitando la transferencia directa de los embriones luego de ser descongelados sin necesidad de efectuar ningún otro procedimiento.

#### **4.6 CONDICIONES DE CULTIVO IN VITRO**

El cultivo *in vitro* de embriones constituye la última de las etapas en el proceso de producción *in vitro* (PIV). Durante esta etapa los embriones son transferidos de un medio a otro con el fin de procurar proporcionarles las mejores condiciones para su crecimiento y desarrollo. El objetivo es proveer las condiciones que favorezcan la división celular, formación del blastocele y el normal desarrollo del embrión desde el estadio de cigoto hasta blastocito, (Koyner y Pino, 2010).

En la producción *in vitro* de embriones, los elementos constitutivos de los medios, son de importancia capital, (Larocca *et al.*, 2010).

El mayor componente de los medios de cultivo es el agua, conteniendo también iones inorgánicos (con funciones catalíticas y fisiológicas) (Palasz *et al.*, 2000); aminoácidos, implicados en la síntesis proteica y vitaminas, que juegan un papel importante como coenzimas en el metabolismo (Lehninger, 1975).

Diversos autores han estudiado el efecto de la adición de hormonas, tales como LH, FSH y  $17\beta$  estradiol, en los medios de maduración y desarrollo. Como alternativa, se pueden emplear suero de vaca en celo (SVC) y/o licor folicular bovino (LFb), componentes biológicos, más económicos (Larocca *et al.*, 1993; 1997). Se ha estudiado el efecto de adicionar LFb a diferentes concentraciones y proveniente de diferentes fuentes al medio de maduración y/o de desarrollo, encontrándose efectos positivos (Larocca *et al.*, 2004). El LFb contiene esteroides, glucosaminoglicanos y muchos otros metabolitos sintetizados por las células de la teca folicular (Romero y Sidel, 1994; Sirard *et al.*, 1995).

Una forma de suplementar proteínas a los embriones *in vitro* es mediante la adición al medio de suero fetal bovino (SFb) o de albumina de suero bovino (BSA). (Palasz *et al.*, 2000). El SFb y la BSA afectan al pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la diferenciación y proliferación celular (Ball *et al.*, 1985).

Los medios de cultivo suelen ser complementados de forma estandarizada con antibióticos para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminantes.

Otros requerimientos de cultivo son la temperatura, el pH, dióxido de carbono y tensión de oxígeno, osmolaridad y humedad relativa.

La osmolaridad óptima en medios de cultivo de embriones bovinos está en el rango de 275 a 285 mOsm. (Gordon, 1994).

El pH del medio de cultivo debe estar entre 7.2 y 7.4, mientras que en los medios de fecundación, se recomienda ligeramente superior (7.6-7.8) (Palasz *et al.*, 2000).

Las condiciones habituales de las distintas etapas de cultivo de embriones son 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El dióxido de carbono resulta necesario para la regulación del pH intracelular (Carner y Bavister, 1986).

La temperatura de cultivo utilizada en general por los investigadores es de 38,5<sup>0</sup>C con el máximo de humedad posible para acercarnos al 100% deseable. Algunos sistemas de cultivo como es el caso de los que emplean el SOF (fluido sintético oviductal), han tratado de disminuir la cantidad de O<sub>2</sub> en la mezcla de gases incrementando la cantidad de N<sub>2</sub>, para disminuir la oxidación de los iones presentes en el medio de cultivo logrando incrementar ligeramente los resultados de desarrollo y eclosión.

#### **4.6.1 SISTEMAS DE CULTIVO EMBRIONARIO**

En la actualidad, el cultivo de los cigotos bovinos y su posterior desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocito, se clasifican de acuerdo al tipo de medio que se utiliza: El cultivo en medios complejos y el cultivo en medios simples (Fukui *et al.*, 1991; Nagao *et al.*, 1995; Hernandez-Ledezma *et al.*, 1996; Marquant-Leguienne y Humbolt, 1998).

Los medios complejos se utilizan usualmente en los sistemas de co-cultivo con células somáticas. Estos contienen en su formulación numerosos componentes, como por ejemplo: aminoácidos, sales, purinas, vitaminas, nucleótidos, factores de crecimiento etc., para suplir tanto las necesidades de los embriones como las de las células utilizadas para el co-cultivo (Bavister, 1995). Además, la concentración de ciertas sustancias del medio puede variar entre lotes, por lo que a estos medios se les llama también medios indefinidos.

Dentro de los medios complejos, el sistema de co-cultivo incrementa el porcentaje de cigotos que llegan al estadio de blastocito, en comparación a la utilización de medios de cultivo simples (Aoyagi *et al.*, 1990; Hernandez-Ledezma *et al.*, 1996; Marquant-Leguienne y Humbolt, 1998).

Los sistemas de cultivo simples o definidos, son aquellos en que el medio de cultivo se prepara a partir de componentes químicos perfectamente definidos (Thompson, 1996). Estos medios se suelen preparar en el laboratorio, por lo que pueden existir variaciones entre las preparaciones de los distintos laboratorios, debido a la precisión de los investigadores en las pesadas de los distintos ingredientes. También acostumbran a catalogarlos como medios definidos, puesto que son medios cuya composición es conocida y concreta, o semidefinidos cuando se suplementan con suero o BSA, ya que la adición de éstos últimos a un medio simple de cultivo altera drásticamente la composición original del mismo (Bavister, 1995).

El sistema de cultivo con medios definidos incluye a los medios SOF, SOFM, CR1aa, CZB, mTLP-PVA y KSOM (Kim *et al.*, 1993; Carolan *et al.*, 1995; Keskinetepe *et al.*, 1995; Lee y Fukui, 1995; Keskinetepe y Brackett, 1996; Takahashi, *et al.*, 1996). Estos medios minimizan la variabilidad de los resultados, debidos a la utilización extra de subproductos de origen animal y tienden a simplificar los sistemas de cultivo (Carolan *et al.*, 1995; Marquant-Leguienne y Humbolt, 1998). Sin embargo, los embriones durante sus primeras divisiones parecen ser bastantes poco tolerantes a los medios complejos y prefieren un medio relativamente simple, con componentes específicos como sales, substratos energéticos y aminoácidos para mantener el desarrollo normal, mientras que en un estado más avanzado del desarrollo (mórulas y los blastocitos), prefieren medios más complejos para evolucionar (Pinyopummint y Bavister, 1994; Barnett y Bavister, 1996).

#### **4.7 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES**

La primera descripción morfológica de un embrión fue realizada por Hartman *et al.*, (1931), luego numerosos grupos de investigación aportaron conocimiento sobre el tema. Esta evaluación no es de ninguna manera un indicador exacto de la viabilidad de los embriones, ya que es basada solamente en una serie de características morfológicas y para poder tener un diagnóstico inequívoco, existen una serie de pruebas relativas a procesos metabólicos celulares o por

medio de tinciones específicas, el inconveniente es que estos métodos comprometen la viabilidad posterior de los mismos (De Armas, 2007).

La evaluación morfológica de los embriones considera los siguientes criterios sobre las estructuras y cualidades de un embrión de excelente calidad. Para la evaluación morfológica es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos:

Forma esferoide, simetría de los blastómeros, tonalidad uniforme, estructuras visibles, estado de agregación de las células, variación de talla entre las células, células desprendidas en el espacio perivitelino e Integridad de la zona pelúcida. Palma (2008) y de Armas (2007).

De acuerdo a su aspecto morfológico los embriones son categorizados en diferentes grados o escalas de calidad:

Grado 1 (Excelentes): Embriones considerados como normales por su respectivo estado de desarrollo. Muestran contornos celulares bien definidos y no hay dispersión ni destrucción en los blastómeros.

Grado 2 (Buenos): Embriones con algunos cambios tales como: granulaciones atípicas, algunas células con signos de degeneración y opacidades anormales.

Grado 3 (Pobre calidad o regulares). Embriones que presentan blastómeros dispersos (poca cohesión) y mayor grado de degeneración, ocasionalmente blastómeros asimétricos, pero parte de la masa celular se mantiene viable.

Grado 4 (Malos): Alto grado de degeneración que imposibilita determinar el grado de desarrollo.

Los embriones de grado 1 y 2 son aptos para programas tanto de transferencia como de criopreservación, los de grado 3 son aptos para transferencia en fresco más no para procesos de criopreservación, y los de grado 4 no son aptos para ningún tipo de programa ya que su grado de daños no les permite el desarrollo normal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue llevada a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología Agropecuaria, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá el cual se encuentra ubicado en el corregimiento de Chiriquí, localizado a los 8°23'15.12" de latitud norte y 82°19'47.48" de longitud oeste. Las características micro climáticas del área son: zona climática tropical de sabana, con una temperatura máxima de 32.0 °C y mínima de 22.1 °C, una precipitación pluvial anual con promedio de 2 856.9 mm y una humedad relativa de 80%. Y se encuentra a una altura de 25 msnm aproximadamente.

**FIGURA 1. INSTALACIONES DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA.**



La duración de esta investigación fue de aproximadamente ocho meses.

Dado que nuestra investigación requería la obtención de embriones *in vivo* e *in vitro* para ser criopreservados según los protocolos a evaluar, la primera parte

del ensayo consistió en la superovulación de vacas donadoras para obtener embriones *in vivo*, para lo cual se utilizaron animales de la raza Simbrah, entre 36 y 96 meses de edad.

Primeramente se realizó palpación rectal de ovarios en todas las candidatas a donadoras, para comprobar que estuvieran ciclando al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio.

El protocolo utilizado para la superovulación fue el siguiente:

Día 0: Implante de Progestágeno (Crestar<sup>®</sup>) + 2cc de Benzoato de estradiol (IM)

Día 4: 28 mg FSH (Folltropín V<sup>®</sup>) Mañana y tarde

Día 5: 26 mg FSH (Folltropín V<sup>®</sup>) Mañana y tarde

Día 6: 24 mg FSH (Folltropín V<sup>®</sup>) Mañana y tarde + 500 mcg Prostaglandina (Sincroplex<sup>®</sup>) en la tarde

Día 7: 22 mg FSH (Folltropín V<sup>®</sup>) Mañana y tarde + retiro del implante y aplicación de 250 mcg de Prostaglandina (Sincroplex<sup>®</sup>) en la mañana.

Día 8: Observación de celo mañana y tarde e inseminación # 1

Día 9: Observación de celo mañana e inseminación # 2

Día 15: Colecta de embriones

La dosis total de FSH fue de 200 mg por animal en dosis decrecientes por vía intramuscular profunda dividido en dos aplicaciones (mañana y tarde).

La dosis de Prostaglandina fue de 2 ml en la tarde del día 6 y 1 ml en la mañana del día 7.

**FIGURA 2. MATERIALES UTILIZADOS PARA LA SUPEROVULACIÓN Y LAVADO.**



Una vez observado el celo en el animal se procedía a inseminarlo 10 horas luego de la observación y se inseminaba nuevamente 12 horas después de la primera inseminación.

A los siete días de la inseminación se realizó la recolección de los embriones por el método no quirúrgico, mediante lavado uterino utilizando un circuito cerrado (bolsa con PBS, tubo Y para recolección de embriones conectado a un filtro y a un catéter de Foley para lavado y jeringa de 20 ml para inflar el balón del catéter).

Luego de efectuado la colecta en la vaca donante, el filtro con los embriones era llevado a un área del laboratorio de Fecundación *In Vitro* donde se les adicionaba PBS mantenido a temperatura de 37°C para eliminar mucosidades y conservar los embriones en condiciones favorables.

Finalmente se pasaba el contenido de cada filtro a una placa de búsqueda de embriones en la cual se procedía por medio de visión estereoscópica a la búsqueda de los mismos. Los embriones fueron mantenidos un plato petri pequeño en el que previamente se había colocado solución de PBS enriquecida (VIGRO™ Holding Plus) como se observa en la figura 3, la cual permite la conservación óptima de los embriones hasta el momento de llevar a cabo la transferencia o como en nuestro caso, la realización de la criopreservación de los mismos.

**FIGURA 3. MEDIO DE CONSERVACIÓN DE EMBRIONES**

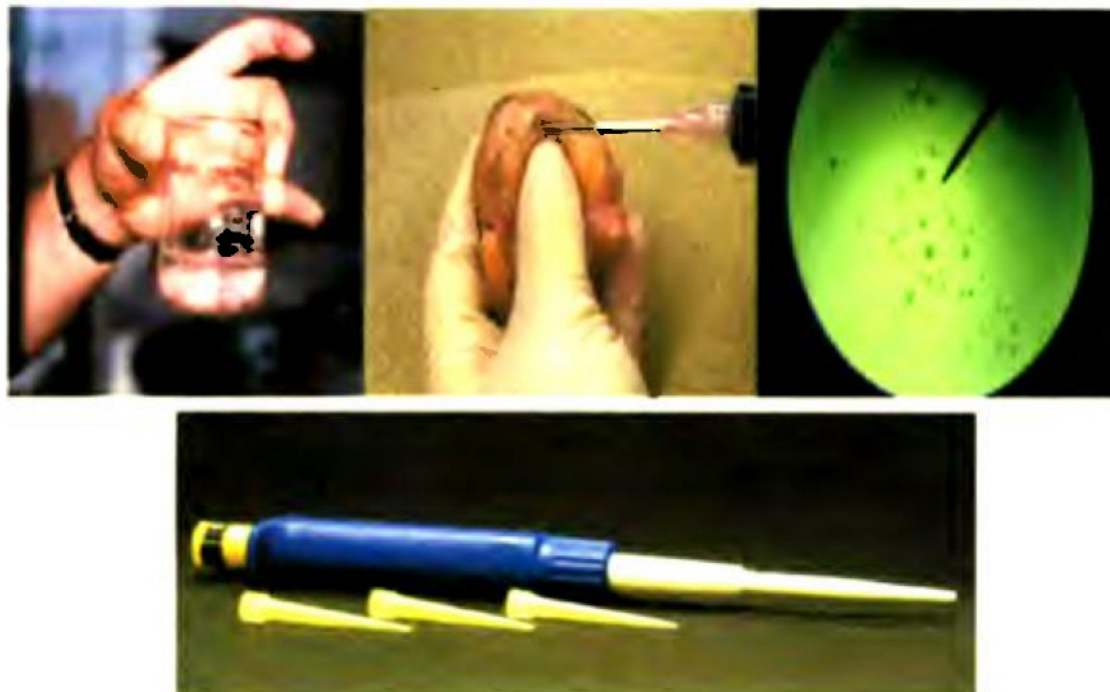


La producción *in vitro* de los embriones se realizó en el Laboratorio de Fecundación *In Vitro* del CIBA.

La metodología utilizada para la producción de estos embriones fue la siguiente:

Se utilizaron ovarios de matadero a partir de los cuales se obtuvieron los ovocitos necesarios para los procedimientos de FIV. La recolección de los mismos en el matadero se realizó dos horas antes de iniciar los procesos de laboratorio.

**FIGURA 4. OBTENCIÓN DE OVOCITOS A PARTIR DE OVARIOS DE MATADERO**



Los ovarios una vez retirados del animal eran lavados dos veces con alcohol y solución salina para luego ser colocados en un termo que contenía solución

salina a una temperatura cercana a los 37°C y se llevaron al laboratorio con la mayor brevedad posible (nunca se sobrepasaron las 3 horas desde la colecta de los ovarios y el inicio de la punción en el laboratorio).

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados en solución fisiológica temperada a 37° C aproximadamente. Posteriormente los ovarios fueron mantenidos en Baño María a 37°C en esta misma solución, en un vaso químico de vidrio de 1000 ml de capacidad.

Para la recuperación de los ovocitos, fueron aspirados todos aquellos folículos entre 2-8mm de diámetro que se observaban en la superficie ovárica. La aspiración se realizó en forma manual utilizando una jeringa de 10 ml con una aguja de 18 G a la cual se le adicionaba 3 ml de medio de colección de ovocitos.

El contenido aspirado con la jeringa fue vertido en tubos cónicos graduados de vidrio de 15 ml, mantenidos en Baño María a 37°C. Una vez finalizado el proceso de aspiración los tubos fueron transportados a una platina temperada para vaciar su contenido (sedimento) a placas Petri cuya superficie inferior se encontraba cuadrículada, para facilitar la búsqueda de los ovocitos. Estas placas fueron mantenidas sobre una platina temperada a 37° C. Los ovocitos fueron buscados bajo visión estereoscópica y una vez localizados fueron depositados en una placa Petri la cual contenía medio de colección de ovocitos, utilizando para tal fin una micropipeta de 5  $\mu$ l y que era mantenida sobre la platina temperada a 37° C.

El protocolo utilizado para la producción de embriones in vitro se puede observar en el cuadro 3.

### CUADRO III. PROTOCOLO DE FIV UTILIZADO PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO

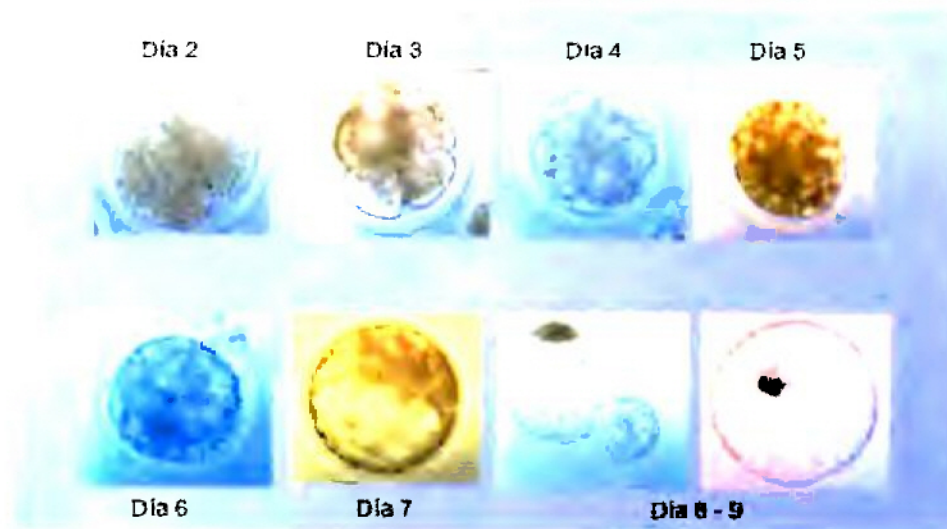
DÍA	ACTIVIDAD	MATERIALES	PRODUCTO
Día anterior al inicio del ciclo	Encendido del incubadora	Incubadora y Agua destilada	Incubadora a 38.5 °C, 5 % de CO <sub>2</sub> en aire y atmosfera saturada de humedad.
Día 0 hora 0	Puesta en equilibración de medios de maduración	Incubadora, platos 6 pocillos, micropipeta de 100-1000 µl, puntas de pipeta, aceite mineral, medio de maduración	Medio de maduración equilibrado
Hora 1	Colecta de ovocitos de ovarios de matadero	Ovarios, agujas de 10 ml sin caucho, jeringa 16 o 18 G, medio de colección de ovocitos, tubo de 15 ml, platina temperada	Ovocitos para seleccionar y poner en maduración
Hora 2	Búsqueda de ovocitos y puesta en maduración	Plato petri de búsqueda, estereoscopio, micropipeta de 10-100 µl, puntas de micropipeta, medio de colección de ovocitos, medio de maduración, aceite mineral, FSH (Folltropín®)	Puesta en maduración de los ovocitos para hacerlos aptos para la fertilización, al momento de colocarlos en el medio de maduración se agregan 20µl de FSH en cada plato de maduración.
Hora 20	Puesta en equilibración de medio de fertilización	Plato 6 pocillos, Micropipeta de 100-1000 µl, puntas de micropipeta, estereoscopio, aceite mineral, medio de fertilización	Medio de fertilización equilibrado y listo para agregar los ovocitos maduros y el semen

Hora 21	Preparación del semen	Estereoscopio, plancha temperada a 38 °C, centrífuga, percoll, medio de lavado de semen, pajuela de semen, tubos de 15 ml, Micropipeta de 100-1000 $\mu$ l	Semen listo para agregar a medio de fertilización: para esto debe tener una concentración de más de 15 millones/ml y más de 80% de vivos.
Hora 22	Fertilización	Estereoscopio, plato 6 pocillos con ovocitos maduros, plato 6 pocillos con medio de fertilización, aceite mineral, semen, micropipeta de 10-100 $\mu$ l, puntas de pipeta	Huevos maduros y semen se colocan en medio de fertilización por 18 horas.
Día 1 hora 14	Equilibración de medio de cultivo	Estereoscopio, plato 6 pocillo, micropipeta de 100-1000 $\mu$ l, puntas de pipeta, medio de cultivo, aceite mineral.	Medio de cultivo equilibrado y listo para colocar los huevos fertilizados
Hora 15	Desnudación de ovocitos	Estereoscopio, platos petri pequeños, medio de Desnudación, micropipeta de 10-100 $\mu$ l, puntas de pipeta, pipeta Pasteur estirada al diámetro del ovocito, manguera plástica con micro filtro incluido.	Ovocitos fertilizados desprovistos de células del cúmulo ya que estas afectan el desarrollo del embrión, este procedimiento no debe exceder los 30 minutos.
Hora 16	Puesta de ovocitos fertilizados en cultivo	Estereoscopio, plato 6 pocillos con medio de cultivo, micropipeta de 10-100 $\mu$ l, puntas de pipeta.	Huevos desnudos y fertilizados puestos en medio de cultivo donde permanecerán por 7-8 días hasta el momento de ser criopreservados
Día 3	Revisión de Clivaje	Estereoscopio, plato 6 pocillos con embriones, aguja	Observar embriones divididos en 2 o más células para

			comprobar efectividad del proceso y despegar embriones cubiertos con demasiadas células del cumulo lo cual imposibilita su desarrollo
Día 7-8	Obtención de blastocitos listos para criopreservación	Estereoscopio, plato 6 pocillos con embriones	Observar los embriones aptos para ser criopreservados para inmediatamente llevar a cabo este procedimiento.

Durante todo el proceso la incubadora utilizada se mantuvo con una temperatura de 38.5°C, 5 % de CO2 en aire y atmósfera saturada de humedad.

**FIGURA 5. ESQUEMA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO A TRAVÉS DEL CICLO DE FIV.**



Fuente: Universidad de Córdoba (2007).

Los medios utilizados han sido descritos por Koyner y Pino (2010), y fueron adquiridos en la Empresa Medica Fértil S.A. que se dedica a la producción de medios para producción de embriones *in vitro* a nivel comercial e incluían: medio de colección de ovocitos, medio de maduración, medio de fertilización, medio de lavado de semen, medio de separación de semen, medio de Desnudación, medio de cultivo, aceite mineral para cultivo embrionario y FSH (figura 6).

**FIGURA 6. MEDIOS UTILIZADOS PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO**

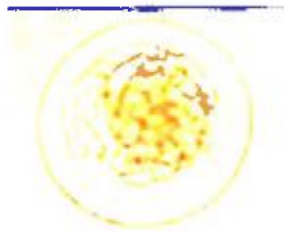


El semen utilizado para la fertilización provenía de un mismo toro de la raza Holstein procedente de la empresa ABS.

La clasificación morfológica de los embriones producidos tanto *in vivo* como *in vitro* se desarrolló de acuerdo a criterios morfológicos descritos por Palma (2008):

Grado 1: excelentes. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniforme, simétricos, de forma esferoide y la zona pelúcida está intacta

**FIGURA 7. EMBRIÓN DE GRADO 1**



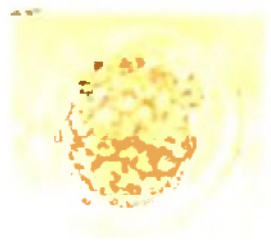
Grado 2: bueno, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Su forma puede ser ligeramente irregular.

**FIGURA 8. EMBRIÓN DE GRADO 2**



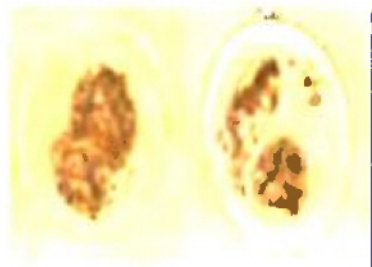
Grado 3: regular, el embrión posee varios defectos: detritus celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento en la zona pelúcida.

**FIGURA 9. EMBRIÓN DE GRADO 3**



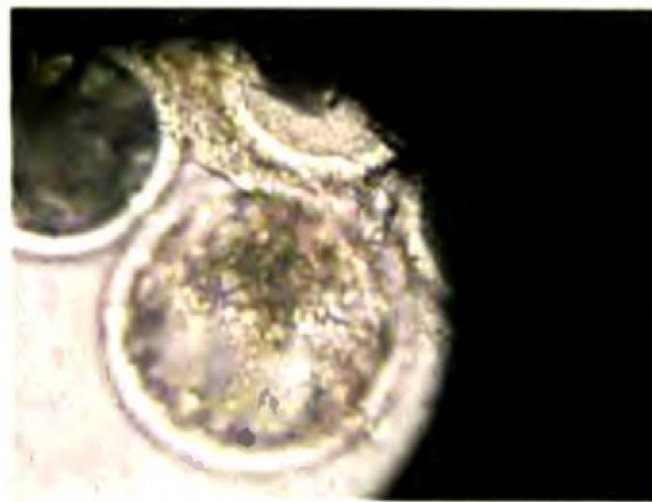
Grado 4: malo, el embrión posee muchos defectos: los correspondientes al grado 3 más desarrollo retardado, sería ruptura de la zona pelúcida –el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella-, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o fragmentación de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y clara degeneración.

**FIGURA 10. EMBRIÓN DE GRADO 4**



En nuestro caso solo se utilizaron para el procedimiento de criopreservación los que coincidían con los grados 1 y 2 tal como recomiendan Palma (2008) y de Armas (2007).

**FIGURA 11. EMBRION OBTENIDO IN VITRO APTO PARA CRIOPRESERVACIÓN**



Luego de la clasificación de los embriones obtenidos ya sea por procedimientos *in vivo* o *in vitro*, se procedió a la criopreservación de los mismos utilizando un protocolo de congelación lenta y dos de vitrificación con los medios que se pueden observar en la figura 12.

**FIGURA 12. CRIOPRESERVANTES UTILIZADOS EN EL ENSAYO**



Los protocolos que se aplicaron a los embriones fueron los siguientes:

**1. Congelación de embriones:** se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Voelkel *et al.*, (1992):

- Se expusieron los embriones a una solución 1.5 M de etilenglicol durante 10 minutos
- Luego los embriones fueron envasados en pajuelas de 0.25 ml.
- Seguidamente se colocaron en un equipo de congelación marca CRYOLOGIC modelo CL 2000 Standard System (figura 13), a  $-7^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.
- El seeding se indujo a los dos minutos.
- Luego se llevaron a una segunda fase de enfriamiento a una tasa de  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  hasta los  $-32^{\circ}\text{C}$ .
- Finalmente, se sumergieron en nitrógeno líquido.

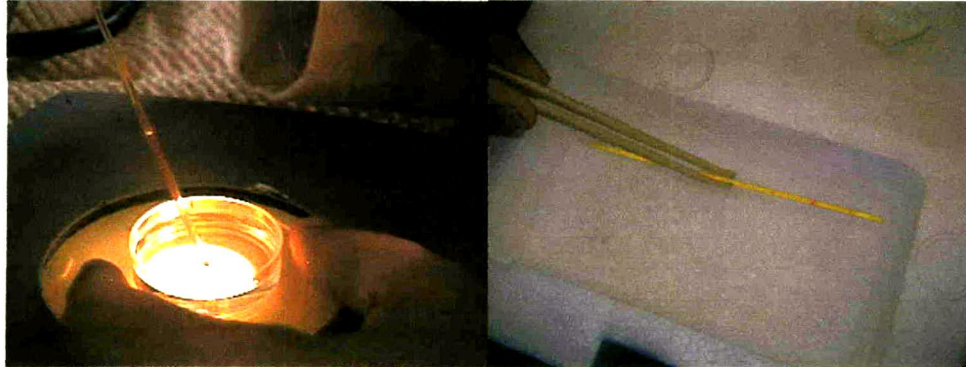
- La descongelación se realizó exponiendo las pajuelas a la intemperie por 10 segundos para luego sumergirlas en agua a 37°C por 10 segundos más.
- Luego se colocaron en un plato petri que contenga 2 ml de medio de mantenimiento (PBS + BSA), para su evaluación morfológica y posterior puesta en cultivo.

**FIGURA 13. EQUIPO DE CONGELACIÓN LENTA.**



- 2. Protocolo 1 de vitrificación:** Los embriones fueron incluidos en una solución al 6.5 M de glicerol más 6 % de suero fetal bovino en PBS, y embalados en pajuelas de 0.25 cc, esto se aplicó en un solo paso durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo fueron sumergidos en N<sub>2</sub> (figura 14)

**FIGURA 14. EMBALAJE DE EMBRION EN PAJUELA DE 0.25 cc Y VITRIFICACIÓN**



- 3. Protocolo 2 de vitrificación:** En este caso la solución crioprotectora consistió en 25% de glicerol, más 25 % de etilenglicol en PBS, durante 2 minutos en un solo pase. y embalados en pajuelas de 0.25 cc. Transcurrido este tiempo fueron sumergidos en N<sub>2</sub> (figura 15).

**FIGURA 15. TANQUE DE NITRÓGENO Y EMBRIONES YA CONGELADOS.**



La descongelación en ambos se realizó en agua corriente a 30 °C por 30 segundos. En ambos protocolos, la extracción del crioprotector se llevó a cabo en una solución 0.5 M de sucrosa + 1% de suero fetal bovino durante 5 minutos. Luego de realizada la descongelación, los embriones se trasladaron a medio TCM 199 para su cultivo y evaluar el desarrollo y eclosión de los mismos por 72 horas. Fueron colocados para tal efecto en grupos de 10 y cultivados simultáneamente según el tratamiento correspondiente. Las condiciones generales de cultivo fueron 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad.

**FIGURA 16. DESCONGELACIÓN Y CULTIVO POST DESCONGELACIÓN.**



Finalmente se procedió a evaluar los embriones por medio de visión estereoscópica para ser clasificarlos en eclosionados y degenerados.

**FIGURA 17. OBSERVACIÓN ESTEREOSCÓPICA POST CULTIVO Y EMBRIÓN ECLOSIONANDO.**



De acuerdo a los métodos de obtención y de congelación a utilizar, se categorizaron 6 tratamientos con 30 embriones para cada uno, con el siguiente ordenamiento:

T1 = Obtención *In Vivo* y Congelación lenta con glicerol

T2 = Obtención *In Vivo* y Vitricación con 6.5 M de glicerol

T3 = Obtención *In Vivo* y Vitricación con 25 % de etilenglicol y 25 % de glicerol

T4 = Obtención *In Vitro* y Congelación lenta con glicerol

T5 = Obtención *In Vitro* y Vitricación con 6.5 M de glicerol

T6 = Obtención *In Vitro* y Vitricación con 25 % de etilenglicol y 25 % de glicerol

Para el análisis estadístico se utilizó un Diseño Completamente al Azar y los datos obtenidos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS, utilizando para tal fin el procedimiento CHI CUADRADO y el procedimiento

CATMOD para variables categóricas según la descripción de Betariz (2002), el grado de significancia utilizado fue del 95 %.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la descongelación y cultivo, y la evaluación morfológica transcurridas 12 y 24 horas para evidenciar la reconstitución del blastocele o degeneración celular, el ensayo arrojó los resultados que se pueden observar en el cuadro IV.

**CUADRO IV. RECONSTITUCIÓN DEL BLASTOCELE Y DEGENERACIÓN DE EMBRIONES A LAS 12 Y 24 HORAS DE CULTIVO.**

Tratamiento	# de embriones cultivados	Reconstitución del blastocele				Degenerados			
		12h		24h		12h		24h	
		n	%	n	%	n	%	n	%
T <sub>1</sub>	30	26	86.67	24	80	4	13.33	6	20
T <sub>2</sub>	30	24	80	21	70	6	20	9	30
T <sub>3</sub>	30	20	66.67	21	70	10	33.33	9	30
T <sub>4</sub>	30	24	80	19	63.33	6	20	11	36.67
T <sub>5</sub>	30	17	56.67	15	50	13	43.33	15	50
T <sub>6</sub>	30	18	60	13	43.33	12	40	17	56.67

Se apreció claramente que para la evaluación de reconstitución del blastocele a las 12 horas, los tratamientos con mayor tasa de reconstitución fueron el T1, T2 que corresponden a embriones producidos *in vivo* utilizando congelación lenta en el primer caso y vitrificación con 6.5M de glicerol como criopreservante en el segundo, y le siguió el T4 que incluía embriones producidos *in vitro* criopreservados mediante congelación lenta.

Estos resultados se pueden sustentar de acuerdo a estudios realizados por Martínez (2006), quien explica que el proceso que posibilita la efectividad de la criopreservación, está relacionado con la superficie de contacto y el tiempo de

exposición del embrión con el criopreservante, siendo el caso de los tratamientos de congelación lenta un tiempo de exposición mayor comparado con los de vitrificación que requieren un paso rápido por el criopreservante para evitar el daño tóxico por la alta concentración del mismo en estos protocolos.

Al evaluar este mismo parámetro a las 24 horas de cultivo, se constató una mayor reconstitución de blastocite en los tres tratamientos que utilizaban embriones obtenidos mediante procedimientos *in vivo* (T1, T2 y T3) que en aquellos obtenidos *in vitro* (T4, T5, T6).

Si tomamos en cuenta el método de criopreservación utilizado y analizamos por separado los embriones obtenidos *in vivo* de los obtenidos *in vitro*, observamos que los mejores resultados a las 12 horas se dieron sobre los embriones que se sometieron a congelación convencional (T1, T4), más que sobre aquellos que se aplico procesos de vitrificación (T2, T3, T5, T6).

Comparando esto con el ensayo realizado por Serrano *et al.*, (2002), que evaluaron tasas de expansión a las 12 horas post cultivo utilizando embriones producidos *in vitro* criopreservados mediante congelación lenta (1.4 M Glicerol) y vitrificación (25 % glicerol + 25 % etilenglicol en tres pasos), sus resultados fueron de 46.7 % de embriones expandidos al utilizar congelación lenta y 38.1 % al utilizar vitrificación, se puede observar que los embriones en nuestro ensayo presentaban un comportamiento similar en cuanto al método de criopreservación pero con tasas de expansión superiores ( 80 % para congelación lenta y 60 % para vitrificación).

En el caso del parámetro degeneración embrionaria, es notorio que tanto a las 12 horas de cultivo como a las 24 horas del mismo, sin tomar en cuenta la procedencia de los embriones, los tratamientos que se sometieron al proceso de vitrificación (T4, T5, T6), fueron los que presentaron un mayor número de embriones degenerados y este efecto es aun más notorio en los embriones de procedencia *in vitro* y con procesos de vitrificación (T5, T6), con más de un 50% de los embriones degenerados a las 24 horas de cultivo.

En el estudio de Serrano *et al.*, (2002), con embriones obtenidos *in vitro*, los porcentajes de embriones degenerados fueron de 36.6% para criopreservación lenta y 40.2 % para vitrificación a las 12 horas de cultivo, siendo menor en nuestro estudio para los embriones criopreservados por congelación lenta (20%) pero coincidía en los protocolos de vitrificación (40%).

A nuestro criterio y de acuerdo con Lonergan (2004), esto puede deberse a que los embriones producidos *in vitro* presentan menos cantidad de blastómeros que los producidos *in vivo*, por otra parte Long (1998) sustenta que los embriones *in vitro* se caracterizan por alteraciones en la organización del citoesqueleto, mayor sensibilidad a la manipulación y a la criopreservación y un detrimento en su competencia para el desarrollo posterior, siendo esta la posible causa de la alta tasa de degeneración post descongelación de los mismos.

Finalmente, se evaluó la tasa de eclosión a las 48 y 72 horas de cultivo lo cual era el indicativo de que el embrión fue capaz de reconstituir su estructura y seguir su desarrollo normal y por ende, que el método de criopreservación

utilizado permitía mantener su viabilidad, obteniéndose las tasas de eclosión que se observan en los cuadros V y VI.

**CUADRO V. RESULTADOS OBTENIDOS POST DESCONGELACIÓN Y CULTIVO CON EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* SOMETIDOS A CONGELACIÓN LENTA.**

Tratamiento	# cultivados	Eclosionados			
		48h		72 h	
		n	%	n	%
T <sub>1</sub>	30	20	66.67	23	76.67 <sup>a</sup>
T <sub>4</sub>	30	15	50	17	56.67 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>35</b>	<b>58.33</b>	<b>40</b>	<b>66.66</b>

Letras diferentes en una misma columna evidencian diferencias estadísticas  $P < 0.05$

Si observamos el comportamiento de los embriones sometidos a procesos de congelación lenta (T1 y T4) como se puede observar en el cuadro V, se tiene que las mejores tasas de eclosión se dan en aquellos embriones obtenidos *in vivo*, lo cual es coincidente con lo que plantea Voektel y Hu (1992) y Leibo (1984), que obtuvieron tasas de eclosión de 70 y 67 % usando como criopreservantes 1.5 M etilenglicol y 1.8 M glicerol respectivamente. En tanto que, utilizando embriones producidos *in vitro*, Sommerfield y Niemann (1999), utilizando etilenglicol 1.8 M obtuvieron tasas de eclosión del 30%.

Este comportamiento se observa claramente en el estudio de Khutana y Niemann (2000), los cuales aplicando un protocolo de congelación lenta con Glicerol 10% obtuvieron un 80% de eclosión para los embriones obtenidos *in vivo* contra solo un 36% para aquellos obtenidos *in vitro*. En contraste, Pugh *et al.*, (1998) y Abe *et al.*, (2002), obtuvieron tasas de eclosión de 60.9 y 75% con

1.8 M de Etilenglicol como criopreservante con embriones in vitro, cuyos resultados contrastan en gran manera con los resultados de los autores enunciados anteriormente.

Al realizar el análisis estadístico para este parámetro se tuvo que la aplicación de congelación lenta presenta diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), siendo más efectiva su aplicación sobre embriones obtenidos in vivo que sobre los obtenidos in vitro con una tasa de eclosión de 76.67% para los primeros versus un 56.67% en el segundo caso.

**CUADRO VI. RESULTADOS OBTENIDOS POST DESCONGELACIÓN Y CULTIVO CON EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* SOMETIDOS A DOS PROTOCOLOS DE VITRIFICACIÓN.**

Vitrificación	# de embriones cultivados	Eclosionados			
		48h		72 h	
		n	%	n	%
T <sub>2</sub>	30	17	56.67	20	66.67 <sup>a</sup>
T <sub>3</sub>	30	16	53.33	18	60 <sup>a</sup>
T <sub>5</sub>	30	9	30	11	36.67 <sup>b</sup>
T <sub>6</sub>	30	11	36.67	12	40 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>53</b>	<b>44.26</b>	<b>61</b>	<b>50.83</b>

Letras diferentes en una misma columna evidencian diferencias estadísticas

$P < 0.05$

En el caso de la vitrificación (cuadro VI), hubo un comportamiento bastante similar al que se obtuvo con el procedimiento de congelación lenta en cuanto a

que las tasas de eclosión fueron mayores en aquellos tratamientos que utilizaban embriones obtenidos *in vivo* (T2, T3) que en aquellos que utilizaban embriones obtenidos *in vitro* (T5, T6).

En este sentido los resultados enunciados por algunos autores son bastante contradictorios entre si, por ejemplo, para el caso de embriones producidos *in vitro*, Dinnyès *et al.*, (1996) usando como crioprotector 6.5 M de glicerol aseveran haber logrado tasas de eclosión del 53 %, Tachakawa *et al.*, (1993) con el empleo de Propalenglicol al 40 % + Ficol 30 % + sacarosa 0.5 M obtuvieron 24 % de eclosión, Kaidi *et al.*, (1999) utilizando 25 % etilenglicol + 25 % glicerol reportan 53 % y Martínez *et al.*, (2002) también con el uso de 25 % etilenglicol + 25 % glicerol, pero adicionando 0,5 M de sucrosa obtuvieron tasas de eclosión de 45 %. En el caso de embriones producidos *in vivo*, Ishimori *et al.*, (1993) quienes ensayaron etilenglicol 25 % + DMSO 25 % obtuvieron tasas de eclosión de hasta un 80%.

En nuestro estudio se observó el mismo comportamiento al hacer el análisis estadístico correspondiente al tipo de embriones empleados, donde se encontró diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos que usaban embriones obtenidos *in vivo* sobre aquellos que utilizaron embriones obtenidos *in vitro*, mas no hubo diferencias cuando se comparó dentro de cada tratamiento de criopreservación para un mismo tipo de embriones (*in vivo* o *in vitro*).

Con relación a que los embriones obtenidos *in vitro* fueron mas susceptibles a la criopreservación que los obtenidos *in vivo*, podemos explicar este comportamiento relacionándolo a características embrionarias reportadas en

estudios de autores tales como (Dorland *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1994; Leibo *et al.*, 1993) que indicaron que en los embriones producidos *in vitro*, hay mayor presencia de micro gotas citoplasmáticas de lípidos las cuales modifican las características de comportamiento físicas y funciones de membranas, lo cual según Gudayer-Joly (1998) puede tener un efecto directo sobre la supervivencia de la célula al proceso de enfriamiento y congelación.

Esto también se relaciona con el medio de cultivo empleado en la producción de los embriones que en nuestro caso fue el SOF (Kim *et al.*, 1993), ya que autores tales como Larocca *et al.*, (2010) y Lehninger *et al.*, (1975) afirman que el tipo de medio de cultivo y los componentes del mismo tienen su efecto sobre el número de embriones obtenidos y la calidad de los embriones producidos.

Si hacemos una comparación de la efectividad del método agrupando todos los tratamientos obtenidos *in vivo* e *in vitro* separadamente, generamos los cuadros presentados a continuación:

**CUADRO VII. EFECTIVIDAD DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LOS EMBRIONES OBTENIDOS *IN VIVO*.**

Tratamiento	# cultivados	Eclosionados			
		48h		72 h	
		n	%	n	%
T <sub>1</sub>	30	20	66.67	23	76.67
T <sub>2</sub>	30	17	56.67	20	66.67
T <sub>3</sub>	30	16	53.33	18	60

Cuando se comparan las tasas de eclosión de embriones obtenidos in vivo (Cuadro VII), se tiene que el tratamiento que utilizaba el protocolo de congelación lenta (T1), es el que logró una mayor efectividad, siendo posible una tasa mayor al 75% de eclosión. Aun así, los valores obtenidos para los tratamientos en que se aplicó vitrificación (T2 y T3), nos dan una tasa de eclosión de entre el 60 y 65%, que aunque fue menor no resultó en una gran diferencia matemática.

En este sentido también se han publicado resultados un tanto contradictorios entre autores, ya que algunos como Voektel y Hu (1992) y Dochi *et al.*, (1995), tuvieron tasas de gestación en transferencia directa de 70 y 69% de gestación respectivamente, usando un método de crioprotección con etilenglicol similar al T1 de nuestro ensayo, mientras Looney *et al.*, (1995) publicaron tasas de solo un 43.6% con el mismo crioprotector. Vale la pena aclarar que si se toma en cuenta que estos ensayos evaluaron la efectividad post transferencia, en ellos hay factores tales como el proceso de transferencia y la variabilidad animal (Hasler *et al.*, 1995; Hasler, 1995; Schermthaler *et al.*, 2000; Liebrich, 1991), que sin dudas son factores de variación adicionales que en cierta medida disminuyen las tasas de viabilidad, pero que pueden ser correlacionados con la aplicación de cultivo *in vitro* empleado en este ensayo.

**CUADRO VIII. EFECTIVIDAD DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LOS EMBRIONES OBTENIDOS IN VITRO.**

Tratamiento	# cultivados	Eclosionados			
		48h		72 h	
		n	%	n	%
T4	30	15	50	17	56.67
T5	30	9	30	11	36.67
T6	30	11	36.67	12	40

En el caso de los embriones obtenidos *in vitro*, la tasa de eclosión de los mismos fue más baja en todos los tratamientos a la que se pudo obtener con los embriones producidos *in vivo*, lo cual coincide con lo enunciado por diversos autores (Massip *et al.*, 1995; Diez, 2003), los que atribuyen esta dificultad para aplicar protocolos de criopreservación a embriones producidos *in vitro*, a que dado que la producción de los mismos se realiza en un ambiente de laboratorio, que intenta simular las condiciones del tracto reproductor femenino, pero si se evalúan las características de los embriones de procedencia *in vitro* con los obtenidos *in vivo*, se corrobora que poseen diferencias estructurales y fisiológicas que pueden afectar la respuesta biológica a la crio conservación. Por ejemplo, Greve *et al.*, (1993); y Holm *et al.*, (1998) aducen que el caso de embriones producidos *in vitro*, el espacio perivitelino en fase de una célula es muy limitado; en estadio de 8 células los blastómeros son irregulares en su forma y tamaño; la compactación de las mórulas es mucho menos pronunciada (en ocasiones no es apreciable), y las células de los blastocitos aparecen oscuras y difusas), debido a una menor cohesión y cantidad de blastómeros presentes, siendo los embriones producidos *in vitro* de igual tamaño a los

producidos in vivo pero con una mayor cantidad de agua intracelular, lo cual puede ser un factor causante de mayores daños durante los procesos de congelación y ser los responsables de la menor tasa de eclosión observada en este tipo de embriones.

El tratamiento con el que se logró la mejor tasa de eclosión fue el que utilizaba embriones criopreservados por congelación lenta (T4) con un 56.67 % de embriones eclosionados en tanto los tratamientos que aplicaban vitrificación solo tenían una efectividad entre el 35-40% de eclosión.

Para el análisis estadístico se utilizó el método de Chi Cuadrado conjuntamente con un procedimiento disponible en el programa SAS<sup>®</sup> conocido como CATMOD de acuerdo a lo descrito por Betariz (2002), permite, mediante el análisis de regresión logística, extender las técnicas del análisis de regresión múltiple al estudio de modelos en los que la variable dependiente no es continua, sino discreta y por medio de ella dar respuestas a preguntas de interés sobre el tema analizado y que a continuación exponemos en los siguientes cuadros:

**CUADRO IX. ENTRADA GENERAL DE DATOS AL PROCEDIMIENTO  
CATMOD**

CATMOD PROCEDURE	
Response: Y	Data Set: HATCH
Response Levels (R) = 2	Frequency Missing: 0
Weight Variable: None	Observations (Obs)= 180
Populations (S) = 6	Total Frequency (N)= 180

Como se observa, se tienen los 2 niveles de respuesta (eclosión o no eclosión), 6 poblaciones que corresponden a los tratamientos (T1:T6) y 180 observaciones, lo cual coincide con el número total de replicas del ensayo.

**CUADRO X. ANALISIS DE VARIANZA DE MAXIMA VEROSIMILITUD**

MAXIMUM-LIKELIHOOD ANALYSIS OF VARIANCE TABLE			
Source	DF	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	3.01	0.0827
OBT	1	5.27	0.0217
CONS	2	8.80	0.0123
LIKELIHOOD RATIO	2	0.35	0.8405

En el cuadro X se observa que al realizar la prueba CHI CUADRADO por medio del procedimiento CATMOD, se constata que hay diferencias significativas tanto para el método de obtención como para el de conservación utilizados así como un coeficiente de verosimilitud (LIKELIHOOD RATIO) de P-valor de 0.8405 el cual es el que nos dice que se acepta la hipótesis nula de que el modelo es acertado para el análisis que se está realizando y por tanto los cálculos llevados a cabo mediante el procedimiento CATMOD, tienen validez.

**CUADRO XI. CÁLCULO DE LOS ESTIMADOS PARA MAXIMA VEROSIMILITUD**

ANALYSIS OF MAXIMUM-LIKELIHOOD ESTIMATES					
Effect	Parameter	Estimate	Standard Error	Chi-Square	Prob
INTERCEPT	1	-0.2728	0.1572	3.01	0.0827
OBT	2	0.3604	0.1570	5.27	0.0217
CONS	3	-0.6834	0.2304	8.80	0.0030
	4	0.3417	0.2185	2.45	0.1178

Basándonos en las fórmulas descritas por Betariz (2002), El programa nos provee de una serie de estimaciones que se pueden observar en el cuadro XI y

que es en base a los cuales podemos desarrollar las preguntas a continuación enunciadas y con ello dar respuesta a interrogantes de interés en el ensayo.

1. ¿Cuánto es más posible que la eclosión embrionaria ocurra si se utilizan embriones provenientes de procedimientos de obtención *in vivo*?

Aplicando la ecuación descrita y reemplazando valores tenemos:

$$e^{2 \cdot \text{método de obtención}} = 2.718282^{2(0.3604)} = 2.06$$

donde  $e = 2.718282$

$e$ : constante de Napier.

Esto quiere decir que hay una probabilidad 2.06 veces más alta de que haya eclosión independientemente del método de criopreservación utilizado, si se utilizan embriones obtenidos por procedimientos *in vivo*.

2. ¿Cuál es la probabilidad de que se logre eclosión del embrión si se utiliza el protocolo de congelación lenta?

En este caso la ecuación a utilizar sería:

$$e^{-2 \cdot \text{método de criopreservación} \cdot \text{coeficiente de estimación}} = 2.718282^{-2(-0.6834)(0.3417)} = 2.79$$

Este valor nos indica que la probabilidad de que se logre eclosión mediante el procedimiento de congelación lenta es 2.79 veces más alto que con el de vitrificación.

Como se puede observar, el procedimiento CATMOD confirma el hecho expuesto en el ensayo de que los embriones obtenidos de procedimientos *in vivo* son los que son capaces de soportar de mejor la criopreservación y que el protocolo de congelación lenta es el que más efectividad nos ofreció a la hora de elegir un programa de criopreservación de embriones.

## CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos arribar a las siguientes conclusiones:

1. Los protocolos de congelación lenta ensayados tuvieron una mayor efectividad que los de vitrificación tanto para embriones producidos *in vivo* como *in vitro*.
2. Los embriones producidos *in vivo* mostraron una mayor tolerancia a los procesos de criopreservación practicados en nuestro estudio.
3. La viabilidad de los embriones post descongelación al evaluar la interacción de ambos factores (método de criopreservación y modo de obtención) señalan al método de congelación lenta y a los embriones producidos *in vivo* como los más eficientes.

## RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados de nuestro trabajo y después de haber alcanzado las conclusiones anteriormente expuestas nos permitimos recomendar:

1. Al momento de implementar un programa de criopreservación de embriones tanto producidos *in vivo* como *in vitro*, se recomienda que se emplee el protocolo de congelación lenta utilizando 1.5 M de etilenglicol.
2. En el caso de embriones producidos *in vivo*, es factible emplear la vitrificación como método de criopreservación en trabajos de campo donde no se disponga de equipos de congelación programables.
3. Se recomienda realizar otras investigaciones que desarrollen los protocolos propuestos en el estudio aplicando transferencia de los embriones para evaluar tasas de gestación y comparar si esta no difiere en gran medida con los resultados obtenidos mediante cultivo *in vitro*.
4. En el caso de los embriones producidos *in vitro* es recomendable ensayar nuevos protocolos de criopreservación que permitan encontrar un sistema más eficiente y viable que la comercialización a gran escala de este tipo de embriones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acker, J. P; McGann, L. E. 1998. The role of cell-cell contact on intracellular ice formation. *Cryo-letters* 19:367-374.
- Akyurt, M. Zaki, G. Habeebullah, B. 2002. Freezing phenomena in ice water systems. *Energy Conversion and Management* 43:1771-1789.
- Aoyagi, Y., Fukui, Y., Iwaumi, Y., Urakawa, M. Y Ono, H. 1990. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocyst. *Theriogenology.*, 34, 749-759.
- Arav, A.; Yavin, S.; Zeron, Y.; Natan, D., Dekel, L; Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187:77-81.
- Ball G .D., Coulan C.B., Field C.S., Harms R.W., Thie J.T., Byers A.P. Effects of serum source on human fertilization and embryonic growth parameters *In vitro*. *Fertil Steril*, 44: 75-79. 1985.
- Barnet, R. E. 1978. The effect of dimethylsulfoxide and glycerol on Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPasa y la estructura de la membrana. *Cryobiology* 15:227-229.
- Barnett, D.K. Y Bavister, B.D. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.*, 43, 105-133.
- Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts artifacts. *Human Reproduction Update.*, 1, 91-148.

- Berger, W K.; Uhrík, B. 1996. Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to cell propagation of intracellular ice in cell chains from salivary glands. *Experientia* 52:843-850.
- Betariz Silva, Javier. 2002. Análisis de variables categóricas mediante el procedimiento CATMOD de SAS®: aplicación a datos de cruzamiento industrial en bovino. España: Universidad Complutense de Madrid, 6 p.
- Bretscher, A. 2000. The cytoskeleton: from regulation to function. *European Molecular Biology Organization*, 61:473-476.
- Cabodevila, J.; Teruel, M. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En: *Biología de la reproducción* (G. A. Palma, eds.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina, Capítulo X, pp. 49-174.
- Cabrera, P., Fernández, A., Bastidas, P. 2006. Vitrificación: Una Alternativa para la Criopreservación de Embriones. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* (En línea). 47 (1): pp. 9-23, citado el 13 de Julio de 2009. Disponible en: [http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-65762006000100003&lng=es&nrm=iso](http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762006000100003&lng=es&nrm=iso)
- Carney, E.W., Bavister, B.D. 1986. Increased atmospheric carbon dioxide stimulates hamster embryo development In vitro. *Biol Reprod.* 34, suppl. 1:199.
- Carolan, C., Lonergan, P., Van Langendonkt, A. y Mermillod, P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following

- oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 43, 1115-1128.
- CIMA. 1988. Transferencia de embriones. Cuba, Ed. MINAG, 245 p.
- de Armas, R., Solano, R. 1995. Manual Práctico de Transferencia de Embriones y Fertilización *in Vitro*. Publicaciones CIMA. Cuba. 118 p.
- de Armas, R. 2007. Transferencia de embriones en el ganado bovino. Panamá: Universidad de Panamá, 117 p.
- Díez C, Le Bourhis D, Heyman Y, Degrolard J. Guyader-Joly C. Renard JP. 2001. Effect of partial lipid removal from bovine zygotes on further survival and freezing tolerance of *in vitro*-produced blastocysts. *Theriogenology*; 55 (4): 923-936
- Diez, C. 2003. Congelación de embriones producidos *in vitro*. Centro de Selección y Reproducción Animal. Asturias, España. En Línea. Disponible [http://www.produccion\\_animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/08-congelacion\\_embriiones.htm](http://www.produccion_animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/08-congelacion_embriiones.htm)
- Dobrinsky, J.R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryo. *Theriogenology* 45:17-26.
- Dochi, O., H. Takakura, K. Imai. 1990. Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. *Japanese J. of Anim. Repr.* 36: 69-72.
- Dochi, O., Imai, K., Takakura, K. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*, 38:179-185.

- Dorland M, Gardner DK, Trounson AO. 1995. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert. Abstr. Ser.* 13: 70.
- Fair, T; Lonergan, P; Dinnyes, A.; Cottell, D. C.; Hyttel, P; Ward, EA. 2001. Ultrastructural of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocysts production. *Mol. Reprod. Dev.* 58:186-195.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Nahito K y Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* (42): 114-119.
- Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A. y Tervit, H.R. 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 92, 125-231.
- Gardner, D. K. 1999. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *J. Reprod. Fert., Supp.* 54:461-475.
- Greve T, Avery B, Callesen H. 1993. Viability of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* (28): 645-654
- Gordon, I. 1994. Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. En: *Laboratory production of cattle embryos* (I. Gordon, eds.). Cab International, Cambridge, UK, Capítulo 6, pp. 293-328
- Gordon, I. 1994. *Laboratory production of cattle embryos*. CAB International,

Wallingford, OXON OX10 8 DE, UK. pp 102.

- Gordon, I. 1996. Transferencia de embriones y técnicas asociadas en el ganado vacuno. En: Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos (I. Gordon, eds.). Acribia, Zaragoza, España, Capítulo 7, pp. 255-385
- Guyader-Joly C. 1998 Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit *in vitro*. Elevage et Insémination 288: 3-23.
- Han M, Yamashina H, Koyama N, Lee K, Fukui Y. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of ivf-derived bovine blastocysts cultured in vitro after freezing and thawing. Theriogenology; 42:645 – 654.
- Hansen, P.J. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle - a review. Theriogenology, 65:119-125.
- Hartman CG, Lewis WH, Miller FW, Sivett WW. 1931. First findings of tubal ova in the cow together with notes on estrus. Anatomical Records , 48: 267-275.
- Hernández-Ledezma, J.J., Villanueva, C., Sikes, J.D. Y Kubisch, H.M. 1996. Increasing the rate of blastocyst formation and hatching from *in vitro* produced bovine zygotes. Theriogenology., 46(6), 961-969.
- Hochi S, Semple E , Leibo S. 1996. Effect of cooling and warming rates during criopreservation on the survival of bovine embryos produced in vitro. Theriogenology; 46: 837 – 847.

- Holm, P. and Callesen, H. 1998. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev*, 38:579-594.
- Irimia, D.; Karisson, J. 2002. Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct. *Biophysical Journal* 162:1858-1868.
- Karow, A. M. 2001. *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists*. En: [www.xytext.com](http://www.xytext.com).
- Kasai, M.; Ito, K.; Edashige, K. 2002. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum. Reprod.*, 17:1863-1874.
- Kasail, M.; Komi, J. H.; Takakamo, A.; Tsudera, H.; Sakurai, T; Machida. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89:91-97.
- Keskintepe, L., Burnley, C.A. y Brackett, B. 1995. Production of viable bovine blastocyst in defined *in vitro* conditions. *Biol. Reprod.*, 52, 1410-1417.
- Keskintepe, L., Luvoni, C., Rzucidio, S. y Brackett, B.G. 1996. Procedural improvements for *in vitro* production of viable uterine stage caprine embryos. *Small Ruminant Res.*, 20, 247-254.
- Kim, J., Niwa, K., Lim, J. y Okuda, K. 1993. Effects of phosphate, energy substrate, and amino acids and development of *in vitro*-matured, *in vitro*-

fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48, 1320-1325.

Koyner, P.; Pino, J. 2010. Estudio y aplicación de las técnicas de maduración, fertilización y cultivo *in vitro*, en la producción de embriones bovinos en Panamá. Tesis: Universidad de Panamá, 120 p.

Kuleshova, L. L., D. R. Mac Farlane, A. O. Trounson, J. N. Shaw. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol – based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38: pp 119-130.

Kuleshova, L.; L. Lopata, A. 2002. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility* 78:449-459.

Larocca, C.S, Calvo. 1993. Effect of follicular fluid and oestrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocyte in vitro. *Theriogenology*, 39: 253.

Larocca C.S., Kmaid, Lago, I., Roses, G., Fila, D., Viqueira, M., Berglavaz, A. 1997. Influence of follicular fluid from different sources on in vitro development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 47: 292.

Larocca, C y Tubino F. 1997. Congelación de embriones bovinos con etilenglicol vs. Glicerol. Uruguay: *Arch. Zootecn.* 46; 295-300.

- Larocca, C., Calvo, J., Lago, I., Roses, G Y Viqueira, M. 2004. Diferentes fuentes de liquido folicular en el desarrollo in vitro de embriones bovinos. Separata de Archivos de Zootecnia. Vol 53, no 203, pp: 329-332.
- Leeuwk, A. M., W. J. H. Daas, W. F. Rall. 1994. Pregnancy rates in a comparative field trial of vitrificación and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology* 41: 326.
- Lehn-tensen, H.; Greve, T; Navas, A. P 1981. Two-step freezing of cow embryos in 1,4 M glycerol. *Theriogenology* 15:49-54.
- Leibo, S. 1977. In: The freezing of mammalian embryos. K. Elliott and J. Whelan, (eds.), CIBA Foundation Symposium. Elsevier/Excerpta Medica. pp. 125-127.
- Leibo, S.P. 1989. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 31:85-93.
- Leibo SP, Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos *Theriogenology*; 40: 81-94.
- Leibo SP, Pollard JW, Martino A. 1995. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*; 43: 265 abstr.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim Reprod Sci* 42: 45-53.

- Leibo, S.P.; Songsasen, N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non domestic species. *Theriogenology*, 57:303-326.
- Lehninger, A.L.1975. *Biochemistry*. Worth Publishers, New York.
- Liebermann, J.; Nawroth, F.; Isachenko, V.; Isachenko, E.; Rahimi, G.; Tucker, M.J. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 67: pp 1671-1680.
- Lonergan, P. 1994. Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta Vet. Scand.*, 35:307-320.
- Looney, C.R., Broek, D., Gue, C., Funk, D., y Faber, D. 1995. Field experiences with bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. *Theriogenology*, abstr. 43:170.
- Long, C.R. 1998. Dual labeling of the cytoskeleton and DNA strand breaks in porcine embryos produced in vivo and in vitro. *Mol Reprod and Develop.* 51:59-65.
- Marquant-Leguienne, B. y Humboldt, P. 1998. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. *Theriogenology.*, 43, 3-11.
- Massip A, Mermillod P, Van Langendonck A, Touze JL, Dessy F. 1995. Survival and viability of bovine blastocysts produced in vitro, fresh and freeze-thawed. *Reprod Nut Dev.* 1995; 35: 3 – 10.
- Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. 1996. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: Implications for their criopreservation. *Human Reprod*; 10(11): 3004 – 3011.

- Mazur P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. IX International Congress of Animal Reproduction & A. I. Vol Y Plenary Sessions General Reports. 16 – 20 June Spain, Madrid. 99 – 114
- Massip, A., P. Van Der Zwalmen F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 7: pp 270-273.
- Massip A, Mermillod P, Dynnes A. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J Reprod Fert* 1993; 97: 65-69.
- Massip A, Mermillod P, Van Langendonck A, Dynnes A. 1994. Veaux issus d'embryons produits *in vitro*, non congelés ou congelés. *Annales de Médecine Vétérinaire*; 138: 333-338.
- Massip A, Mermillod P, Dynnes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro*-produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reprod*; 10(11): 3004-3011.
- Matsushita, S.; Tani, T.; Kato, Y.; Tsunoda, Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 84:293-301.
- Mazur, P. 1984. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mamalian ova and embryos. *Anim. Repr. Sci.* 28: pp 239-245.

- Miyake, T., M. Kasay, S. E. Zhu, T. Sakurai, T. Machida. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene based solution by a simple method. *Theriogenology* 40: pp 121-134.
- Morris, J. 2000. Asymptote cool guide of cryopreservation. En: <http://www.asymptote.ca.uk>
- Moussa, M.; Tremoleda, J.L.; Duchamp, G.; Bruyas, J.F.; Colenbrander, B.; Bever M.M.; Daels, P.F. 2004. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 degrees C. *Theriogenology*, 61:921-932.
- Mucci, N.(1), Aller, J.(1), Cabodevila, J.(2), Kaiser, G.(1), Hozbor, F.(1) y Alberio, R.H.(1). 2005. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *Taurus*, Bs. As., 7(26):20-35.
- Mukaida, T.; Wada, S.; Takahashi, K.; Pedro, P.B.; An, T.Z.; Kasai, M. 1998. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reproduction*, 13: pp 2874-2879.
- Muldrew, K.; McGann, 1. E. 1994. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal* 66:532-541.
- Nagao, Y., Saeki, K., Hoshi, M. y Nagai, M. 1995. Early development of bovine embryos. *J. Reprod. Dev.*, 41(5), 129-136.

- Naitana S, Loi P, Ledda S, Cappai P, Dattena M. 1996. Effect of biopsy and vitrification on the *in vitro* survival of bovine embryos in different stages of development. *Theriogenology*; 46: 813 – 824.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 35:109-124.
- Oberstein, N.; O'Donovan M. K.; Breummer, J.E.; Seidel, G.E.Jr.; Carnevale, E.M.; Squires, E.L. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, 55: pp 607-613.
- Palasz, A.T., Tornesi, M.B., Archer, J., Mapletoft, R.J. Media alternatives for the collection, culture AND freezing of Mouse AND cattle embryos. *Theriogenology* 44:705-714. 1995.
- Palasz, A.T.; Mapletoft, R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, 14:127-149.
- Palma, G. 2008. *Biología de la reproducción*. 2da. Edición, Argentina, 668 p.
- Petit, V A.; Edidin, M. 1974. Lateral phase separation of lipids in plasma membranes effect of temperature on mobility of membrane antigens. *Science* 184:1183-1185.
- Pinyopummintr, T. y Bavister, B.D. 1994. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*., 44(4), 471-477.

- Prins, J.B.; Fox, R.R. 1984. A successful technique for the preservation of rabbit embryos. *Lab. Anim.*, 34: pp 484-487
- Rall, W E; Polge, C. 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J. Reprod. Fert.* 70:285-292.
- Rall, W E; Fahy, G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°- C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Rall, W. E; Meyer, T K. 1989. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 31:689-692.
- Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:237-245.
- Romero, A., Seidel J.E. 1994. Effects of bovine follicular fluid on the maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 383-394.
- Saha, S., T. Otoi, M. Tagaki, A. Boediono, C. Sumantri, T. Suzuki. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33: 291-299.
- Schiewe, M.C., W. F., Rall, L. D. Stuart, D. E., Wildt. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*. 36: pp. 279-293.
- Schneider, H.J. Jr., R.S. Castleberry, and J.L. Griffin. 1980. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* 13:73-85.

- Shaw, J.M.; Oranratnachai, A.; Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59-72.
- Shaw, J.M.; Jones, G.M. 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update*, 9:583-605.
- Sirard M.A., Roy F., Patrick B., Mermillod P., Guilbault L.A. 1995. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology*, 44: 85-94.
- Sommerfeld, V., H. Niemann, 1999. Cryopreservation of bovine in vitro Produced Embryos Using Ethylenglicol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology* 38: pp 95-105
- Squires, E.L.; McCue, P.M.; Vanderwall, D. 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51: pp. 91-104.
- Takahasyi, Y., Hishinuma, M., Tanaka, H. y Kanagawa, H. 1996. Development of *in vitro* matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.*, 58, 897-902.
- Tanaka, H.; Ballarales, P.; Masaki, J.; Kanagawa, H. 1997. Biotécnicas con embriones. En: *Teoría y práctica de la fecundación in vitro* (H. Tanaka; P. Ballarales; J. Masaki y H. Kanagawa, eds.). Agencia de Cooperación Internacional del Japón, Valdivia, Chile, Capítulo V, pp. 59-80.

- Thompson, J.G. 1996. Defining the requirement for bovine embryos culture. *Theriogenology.*, 45, 27-40.
- Thompson JG, Gardner DK, Pug, PA, McMillan WH, Tervit HR. 1994. Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development embryos. *J Repr Fert; Abstract Series 13*: 25
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1996. Factors affecting survival rates of in vitro produced embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim Reprod Sci.*; 45: 191 – 200.
- Vajta G, Hyttel P, Callesen H. 1997. Morphological changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification in straw direct rehydration and culture. *Mol Reprod and Dev*; 48: 9 – 17.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Callesen H. 1998. Open Pulled Strw (OPS) Vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Repr. Dev.* (51): 53-58
- Vajta G. 2000. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Anim Reprod Sci.*; 60: 357-364.
- Vajta, G.; Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
- Van Langendonck AM, Den Daas JHG, Kruij TA, Rall WF. 1995. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology* 32 (2): 157-67.
- Van Zutphen, L.F.M.; Hedrich, H.J.; Van Oortmerssen, G.A.; Prins, J.B. 1993.

Genetic Standardization. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. En: Principles of Laboratory Animal

Vázquez, Y.; Borque, C.; Díaz, C. 1998. Criobiología aplicada a Reproducción Animal. Arch. Zootec., 47:375 (Abstr.). Science (L.F.M. Van Zutphen; V. Baumans y A.C. Beynen, eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, Capítulo 7, pp. 127-142

Vila, L., Carretero, E 1985. Manejo de congeladores programables. Biol. Clin. Hematol. 7:61-67.

Visintin, J.A.; Martins, J.F.P.; Bevilacqua, E.M.; Mello, M.R.B.; Nicacio, A.C.; Assumpção, M.E.O.A. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different?. Theriogenology, 57:345-359.

Voelkel, S. A.; Hu, Y. X. 1992. The use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. Theriogenology 37:687-697.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 197. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. Science; 178: 411-414.

Whittingham, D.G.; Wood, M.; Farrant, J.; Lee, H.; Halsey, J.A. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 degrees C. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56: pp 11-21.

Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA. The viability of deep frozen cow embryos. *J Reprod Fertil* 1978; 52: 391-393.

- Wikipedia. 2011. Definición de criopreservación. Internet. Disponible en:  
<http://www.wikipedia.com>
- Wilmut I. 1972. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci*; 11: 1071-1079.
- Wolfe, J.; Bryant, G. 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute water systems. *Cryobiology* 39:103-129.
- Yuswiati, E., W. Holtz. 1990. Successful transfer of vitrified goat embryos. *Theriogenology*. 34: pp 629-632.
- Zachariassen, K. E., Kristiansen, E. 2000. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* 41:257-279
- Zambrano, A. 2008. Efecto del retiro del crioprotector en cuatro pasos vs transferencia directa sobre la tasa de preñez de embriones bovinos congelados en etilenglicol. Tesis: Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 142 p.
- Zhu, S.E.; Kasai, M.; Ootoge, H.; Sakurai, T.; Machida, T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98: pp 139-145.