

MÉTODOS Y APLICACIONES DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE OOCITOS Y EMBRIONES EN BOVINOS Y OTROS MAMÍFEROS. UNA REVISIÓN

Methods and Applications of Bovine and other Mammals Oocytes and Embryos Cryopreservation. A Review

Noris Roa A.*
Tiburcio Linares*
Rita Tamasaukas**

* Instituto de Investigaciones Zootécnicas. CENIAP-FONAIAP
Ave. Universidad. Maracay, Estado. Aragua, Venezuela
Telefax: 043-831655; 342385.

** Universidad Rómulo Gallegos
San Juan de los Morros, Estado Guárico, Venezuela
Telefax: 043-320729.

RESUMEN

Producto del auge internacional del trasplante de embriones y por la necesidad de conservar oocitos fecundados se han desarrollado un gran número de investigaciones sobre éste tema con el fin de crear bancos de germoplasma que garanticen la disponibilidad de este material de alto valor genético durante largos períodos de tiempo sin perder su viabilidad y a su vez resolver los problemas de disponibilidad de receptoras perfectamente sincronizadas por una parte y la no obtención de embriones transferibles en algunas donantes. En la actualidad la criopreservación ya cuenta con equipos que realizan el proceso automáticamente utilizando diferentes programas y productos. La posibilidad de congelar abre las perspectivas para el intercambio comercial entre países salvando las regulaciones sanitarias, facilitando y abaratando la transportación de éstos, brindando los beneficios de un material genético altamente valioso. Una tercera parte de los embriones colectados en USA y Europa son criopreservados. Esta es una área de rápido avance tecnológico y científico basados en los conceptos que envuelven el campo de la criobiología, embriología y la reproducción animal. Con la finalidad de revisar los últimos avances ocurridos en investigación en relación a los aspectos criobiológicos que involucra este tipo de tecnologías de criopreservación de

oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos se hace la presente revisión bibliográfica.

Palabras clave: Criopreservación, embriones, oocitos.

ABSTRACT

Product of the international development of the transfer of embryos and by the need of preserving fertilized oocytes, have been developed a great number of researches in this topic in order to create banks of germoplasm, that guarantee the availability of this material of high genetic value during long periods of time without losing their viability and at the same time to solve the problems of availability of recipient perfectly synchronized by a part and the not obtainment of transferable embryos of some donors. At present the cryopreservation already has equipment that accomplish the process automatically using different programs and products. The possibility of freezing open the perspectives for the commercial exchange among countries saving the sanitaries regulations, facilitating and cheapening transportation, offering the benefits of a highly valuable genetic material. A third part of the embryos collected in USA and Europe are cryopreserved. This is an area of rapid scientific and technological advancement based on rapidly evolving concepts in the fields of cryobiology, embryology and animal reproduction. In order to revise the last advances in this researches in relationship to the cryobiologic aspects that involves this type of technologies of oocytes and

embryo bovines and other mammal cryopreservations was made the present review.

Key words: Cryopreservation, embryos, oocytes.

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores de vital importancia para el desarrollo de la ganadería es la reproducción, la cual se debe tener en cuenta para una eficiente explotación pecuaria. La mayor parte de los países tropicales se caracterizan por un bajo nivel reproductivo, donde anualmente, las pérdidas alcanzan millones de toneladas de carne y leche que afectan grandemente la alimentación de la población, por las crecientes necesidades de proteína animal, lo que constituye un factor cada vez más importante en el estancamiento económico que influye negativamente en el bienestar de la población.

Además es alarmante, que más de 200 especies de animales en Europa se están extinguiendo, aunque muchos países han desarrollado nuevos programas para la conservación de estas especies empleando varias técnicas como la congelación de espermatozoides, óvulos y embriones.

Este potencial bioreproductivo está controlado en el macho, gracias a las propiedades del glicerol como crioprotector [33], que hace posible la conservación del espermatozoide en varias especies de animales para inseminación artificial. Pero en la hembra bovina, éste aspecto solo puede ser aprovechado a través del trasplante de embriones, ya que se puede estimar que en cada ciclo estral, al menos ocho o nueve folículos degeneran en el transcurso del crecimiento, para que ovule uno [20].

La transferencia de embriones en este sentido amplía las posibilidades de aprovechar la gran cantidad de oocitos que existen en los ovarios de una hembra, aplicando tratamientos de superovulación con hormonas como FSH-P y la PMSG, incrementando hasta diez veces la media de ovulaciones, con respuestas variables [52].

La congelación de embriones en el momento de la recolección, nos ofrece ventajas como: disponer de un material genético durante largos períodos de tiempo sin afectar su viabilidad, traslado a largas distancias, disminuir riesgos de introducción de enfermedades etc.; por esto, la congelación de embriones resulta ser una técnica de grandes perspectivas. Así mismo, en las últimas tres décadas, la criopreservación de embriones y oocitos ha comenzado a ser una herramienta de gran uso para interrumpir y controlar los ciclos reproductivos en las hembras. Las más recientes investigaciones aplicables se han desarrollado mayormente en cuatro especies: ratones, ganado bovino y humanos [36, 54].

El objetivo de esta revisión fue resumir los diferentes métodos existentes para criopreservación de oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos, como también sus aplica-

ciones, ya que existen diversidad de trabajos y criterios personales de diferentes investigadores, en cuanto a los métodos de criopreservación, ya que esta técnica requiere una continua observación de todas las causas que puedan afectar los resultados de viabilidad por congelación y de gestación, cuando se emplea este método.

ANTECEDENTES

En 1953 Smith [41], intenta congelar embriones en animales domésticos, luego del descubrimiento de la acción protectora del glicerol, demostrando que la exposición de embriones de animales domésticos a bajas temperaturas (-79°C y -196°C) no afectó el desarrollo de éstos, aunque sólo el 1% de los embriones de conejos con una célula, continuó su división después de la descongelación en presencia de un 15% de glicerol.

Veinte años después, Whittingham y colaboradores [47], utilizaron bajas temperaturas para la congelación y almacenamiento de embriones con éxito. Wilmut y Rowson [44] y Whittingham y col. [47], describieron los primeros trabajos de congelación de embriones a bajas temperaturas (-196°C), con velocidades de congelación relativamente bajas (0,2 - 2,0 °C/min.); y descongelación de 4 - 25 °C/min., empleando el Dimetil Sulfoxido (DMSO), como agente crioprotector, FIG. 1.

Otras modificaciones recientes del método de congelación han demostrado que los embriones pueden sobrevivir a la descongelación rápida a temperaturas elevadas [14,21,22,45]; logrando reducir alteraciones morfológicas después de la descongelación en un rango de 60 al 70% en cultivo, y de 25 a 30% de gestación al ser transferidos a novillas receptoras. Actualmente, ésta técnica ofrece resultados que alcanzan hasta 60% de gestación [4,6,7,37].

PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN LA CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE EMBRIONES EN ANIMALES DOMÉSTICOS

La combinación de una o de varias de las principales variables de la criobiología, pueden ser responsables de una preservación exitosa o deficiente [1].

Principales Variables de Criobiología:

1. Tipo y concentración de los componentes crioprotectores.
2. Formación del hielo.
3. Tasa de enfriamiento (-5°C a -70°C).
4. Temperatura de almacenamiento.
5. Tasa de descongelación (-70°C a -5°C).
6. Tasa de dilución y temperatura.

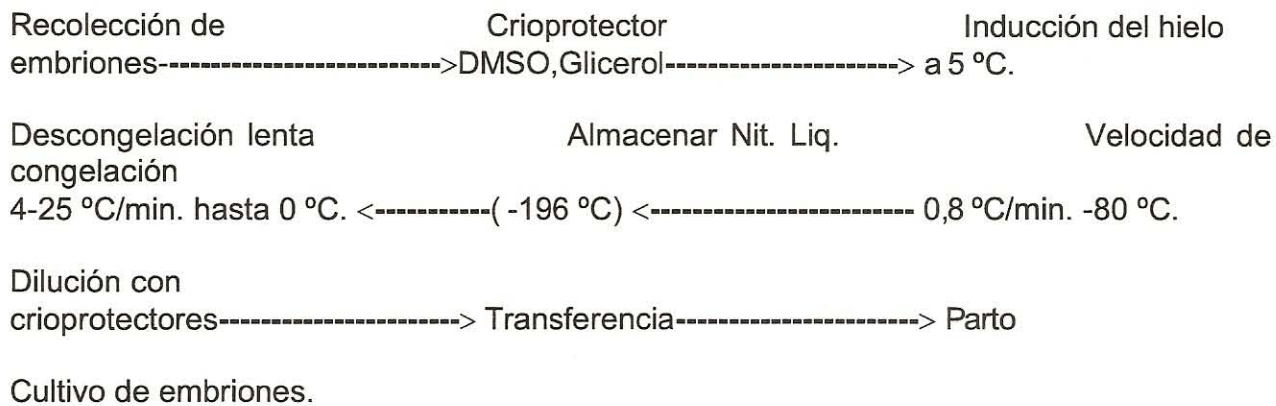


FIGURA 1. MÉTODO ORIGINAL PARA LA CONGELACIÓN DE EMBRIONES. Whittingham [47].

Primero. Existe una amplia variedad de componentes semejantes, que han demostrado proteger a las células, de los daños que puedan sufrir por la congelación. Estos componentes son usualmente divididos en dos categorías, los que permiten *penetrar* o proteger las células (Glicerol, Dimetil Sulfoxido y el Etilen Glicol) y los *no penetrantes* a las células (sacarosa, polivinilpirolidona, hidroxietil almidón HES, Dextrano, Albúmina). Los no penetrantes como la sacarosa, mantienen una alta presión osmótica en el medio extracelular durante la remoción del crioprotector. Esto previene el shock osmótico, debido a la difusión del glicerol fuera del embrión después de la descongelación [24]. Aunque existe gran cantidad de literatura que describen la responsabilidad de éstos componentes crioprotectores en la integridad de la célula congelada, los mecanismos de acción fundamentales para esto, aún son desconocidos.

Segundo. Formación de Hielo. Se sabe que el punto de congelación de una solución depende del número de moléculas de soluto presente. Por ejemplo, el punto de congelación de una solución acuosa de 0,165 M (isotónica) NaCl, es cerca de - 0,6°C. Los puntos de congelación de soluciones isotónicas de NaCl que contienen glicerol 1M, 2M o 3M, es de -1,9 °; - 4,6°; y - 8,1°C, respectivamente. Esto significa que el hielo no se forma en éstas soluciones hasta que su enfriamiento baje a su respectivo punto de congelación. Solamente, dependiendo de la extensión del volumen congelado existente, soluciones acuosas exhiben un comportamiento no estable, donde la super congelación baja el verdadero punto de congelación, sin formación de hielo.

Un volumen de aproximadamente 0,5 ml o menos, de una solución acuosa pueden, frecuentemente, supercongelarse 10 ó 15 grados menos de su verdadero punto de congelación. Este fenómeno de super congelación puede jugar un papel crítico en la supervivencia de las células que comienzan a congelarse, especialmente los embriones y oocitos de mamíferos, ya que éstas células tienen un comportamiento osmótico específico.

Cuando la célula es transferida de una solución isotónica a una hipertónica, ella responde osmóticamente perdiendo agua para mantener el equilibrio entre la solución intracelular y la extracelular. Los dos estados de la célula (hidratada y medio deshidratada), pueden determinar en gran parte, el destino de la célula cuando es enfriada y congelada a temperaturas bajo cero grados centígrados. FIG. 2.

Tercero. Tasa de Enfriamiento. Las células deben ser enfriadas a tasas altas o bajas que garanticen su supervivencia, a la congelación y a la descongelación. Afortunadamente existen tasas óptimas de enfriamiento con un alto porcentaje de supervivencia a muchos tejidos de células. Mazur [25,26], fue el primero en reconocer las diferencias que existían en los varios tipos de células, en relación a las tasas óptimas de enfriamiento. Esto es debido a la diferencia que existe en los coeficientes de permeabilidad de las células al agua y el coeficiente de temperatura de los tipos de células, FIG. 3.

Cuatro. Temperatura de Almacenamiento. En general se utilizan dos temperaturas, -80°C y -196°C. Las células pueden ser preservadas por largo tiempo en depósito a -130°C, temperatura de transición del cristal al hielo. La forma de extender el tiempo y la seguridad del depósito de células congeladas, es introducirlas en el líquido (-196°C); o en vapor (-150°C) del nitrógeno líquido.

Quinto. Tasa de Descongelación. Existe una fuerte interacción entre los efectos de la tasa de enfriamiento y la tasa de descongelación en relación a la supervivencia de la célula. El tiempo de congelación a -196°C, de un embrión, el cual ha sido enfriado a 0,2 °C/min, es muy diferente, que uno que ha sido enfriado a 2 °C/min. Esto se puede explicar, en términos de permeabilidad del agua, de cuales fueron los verdaderos efectos de la tasa de enfriamiento. Un embrión enfriado muy rápidamente tiene poco tiempo para deshidratarse, así, cuando un embrión es descongelado, sujeto a dilución en su medio de suspensión, al comenzar a derretirse el hielo, la solución de Me₂So comienza a derretirse a -70°C, a esta temperatura la

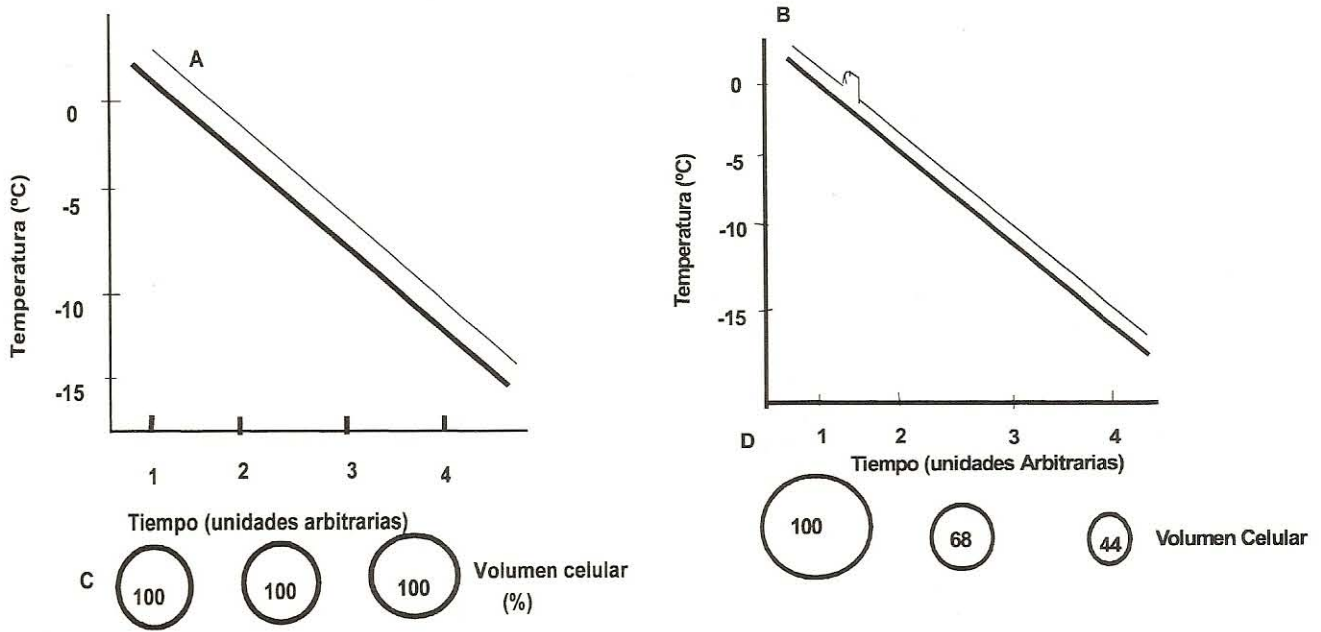


FIGURA 2. DIAGRAMA DE TEMPERATURA DE CONGELAMIENTO. (A) SIN SEEDING, (B) CON SEEDING. ABAJO, CAMBIOS PRODUCIDOS EN EL VOLUMEN CELULAR EN LOS EJEMPLOS (C,D).

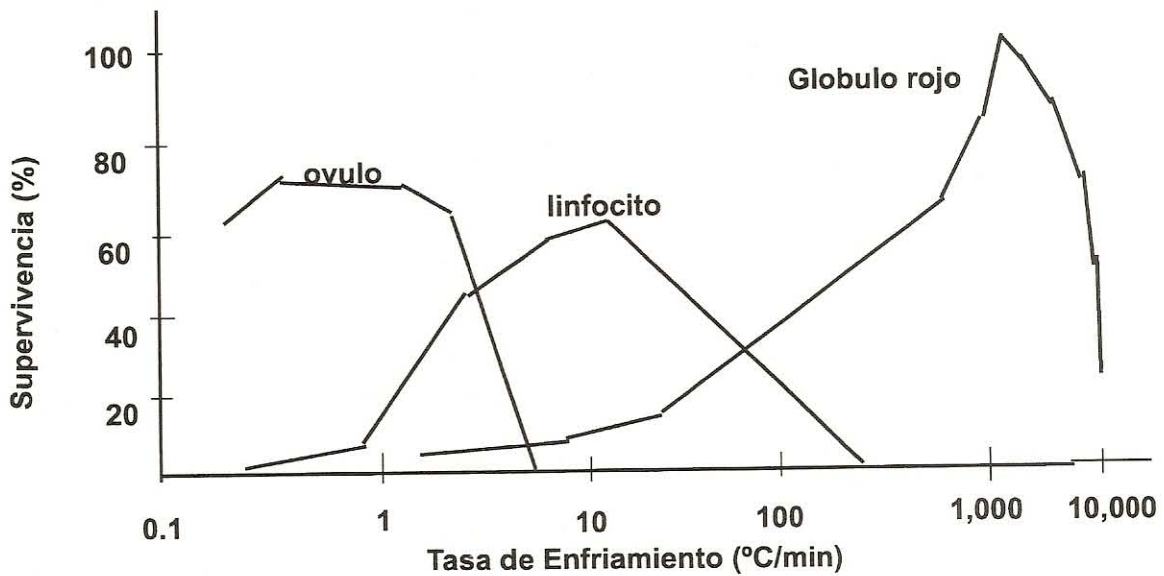


FIGURA 3. SUPERVIVENCIA DE TRES TIPOS DE CÉLULAS EN DMSO EN FUNCIÓN DE LA TASA DE ENFRIAMIENTO. Leibo y colaboradores [15].

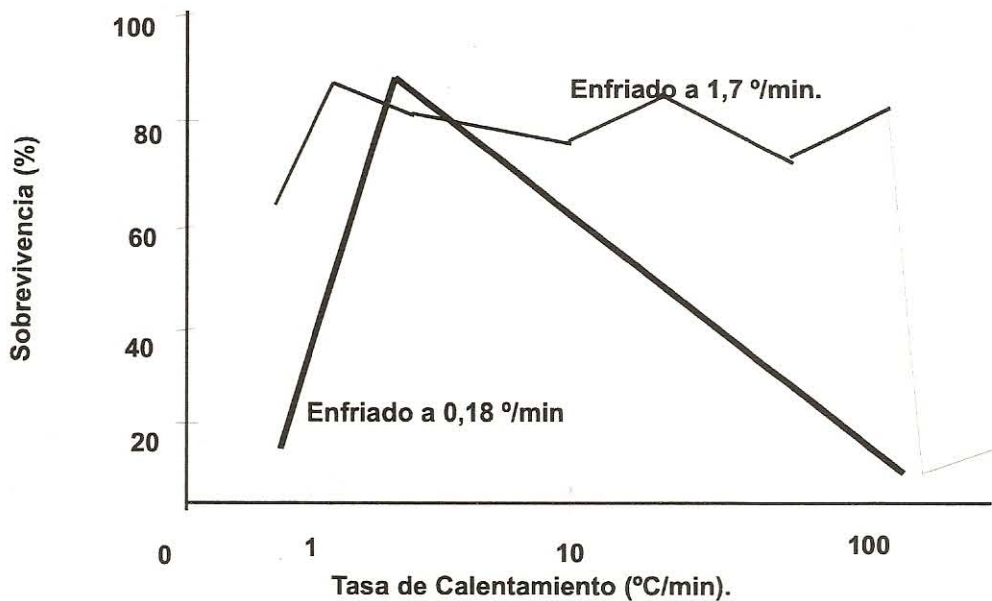


FIGURA 4. SOBREVIVENCIA DEL EMBRIÓN DE RATÓN EN FUNCIÓN DE LA TASA DE CALENTAMIENTO. Leibo [18].

concentración de la solución ligeramente descongelada estará al menos en 10 M. Si la concentración original de Me_2So fue 1 M, entonces la solución volverá a ésta concentración cuando se completa el derretido.

Inevitablemente el embrión congelado a 1 M de Me_2So puede ser expuesto a muy altas concentraciones de soluto, a bajas temperaturas y puede ser expuesto a concentraciones decrecientes de suspensiones calentadas a temperaturas altas. Cuando el embrión es calentado y la solución extracelular comienza a disolverse, las propiedades osmóticas del embrión requieren intentar equilibrarse con la solución descongelada. Si la tasa de calentamiento es moderada, el embrión, aparentemente, puede permanecer en equilibrio osmótico cuando es calentado. Si la tasa es alta, el embrión puede sufrir una rehidratación larga o rápida durante el calentamiento. Aparentemente si la rehidratación es muy baja y rápida, el embrión muere, FIG. 4.

Sexto. Tasa de Dilución y Temperatura. Se refiere a la tasa y temperatura a la cual la célula del embrión es diluida fuera de la dilución en la cual, fue originalmente congelada. Los embriones mamíferos, para sobrevivir la congelación, deben ser suspendidos en una solución de criopreservativos, Dimetil Sulfóxido o Glicerol [47] o varios Gliceroles [28, 37]. Sólo del Glicerol se ha explicado y demostrado su difusión en óvulos y embriones de mamíferos. Con embriones congelados, hay que tener mucho cuidado con la dilución de los componentes protectores, en forma semejante, para evitar el choque osmótico.

Este choque puede ocurrir, si el embrión tiene una alta tasa de concentración de solutos protectores y es de repente,

transferido a una solución isotónica. El agua se mueve más rápidamente hacia dentro del embrión, que el soluto salir de él. Aún cuando el embrión es rodeado por la zona pelúcida, el aumento de volumen, es suficiente para romper las células del embrión por sí solos. Numerosos métodos han sido descritos para evitar el choque osmótico de embriones [15]. Uno es diluir la solución extra embrionaria, por una serie de diluciones lentamente; otra es subir la temperatura a la cual, el embrión es diluido. Estos incrementos de tasa a la cual la solución protectora fluye fuera del embrión, es como reduce las diferencias de presión osmótica intra y extra celular.

MÉTODOS

Desde hace algunos años se han propuesto diversos programas de congelación, caracterizados por tratar de reducir el tiempo mínimo necesario para congelar los embriones y por otra parte, simplificar las operaciones de manipulación durante la criopreservación.

En general se tienen dos metodologías de conservación de embriones, a. Conservación *in vitro* (corto plazo) y b. Conservación mediante criogenia (largo plazo).

Conservación a Corto Plazo

Se utiliza para la realización de trasplante de embriones en ganaderías cercanas, donde la duración de la conservación del embrión es máximo de tres días a una temperatura de 37°C , en embriones de 7 a 8 días de edad: 1. Se obtienen los embriones evitando el shock térmico (conservación a 37°C), se preparan para ser trasladados al medio de cultivo;

2. Medio de cultivo PBS (Phosphate Buffered Saline), adicionándole 25 mg. de Kanamicina/litro y 20 ml de suero inactivo de ternera, en 20% de proporción; 3. Introducir, para conservación, el medio en tubos de ensayo sometidos a una atmósfera artificial integrada por CO₂ = 5%; O₂ = 5%; N₂ = 90%; 4. Evitar manipulaciones bruscas.

Medios de cultivo de ovulos *in vitro*:

Solución de Sales:	g/L	M-10-3
NaCl	6,975	119,32
KCL	0,356	4,78
CaCl ₂	0,189	1,71
KH ₂ PO ₄	0,162	1,19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,294	1,19
NaHCO ₃	2,106	25,07

Aditivos:

Penicilinas G	100/ml
Estreptomocina	50 µg/ml
Seroalbúmina de vaca, cris	1.000 g/L.

Otras Condiciones:

Osmolaridad	0,308 osmol.
PH	7,38
Temperatura	37°C.

En mantenimiento en cápsulas de Petri, en atmósfera húmeda que contenga 5% de CO₂.

Conservación Mediante Criogenia (Largo Plazo)

Aquí se utiliza la congelación y ésta va marcha adelante, donde existen matices técnicos muy personales, de allí la gran cantidad de variantes existentes en las técnicas generales realizadas por muchos investigadores, lo que hace difícil su interpretación. Por ello, se resumen las metodologías básicas existentes y las más aplicables a nivel de campo, señalando algunas variantes de ellas, TABLA I.

Método I: Fue el primer método desarrollado por las experiencias de investigación en este aspecto. En resumen, implica un enfriamiento de embriones lentamente a una baja tasa con temperatura bajo cero, luego se sumerge en nitrógeno líquido a -196°C, para después ir calentando lentamente hasta lograr la descongelación. El tiempo total requerido para congelar y descongelar, es aproximadamente dos horas con treinta minutos [47].

Método II: Desarrollado por Willadsen y col. [46], requiere que los embriones solamente sean congelados lentamente, con una temperatura relativa alta hasta aproximadamente -33°C, así se reduce el tiempo necesario para congelación. Por ello, requiere que éstos embriones congelados sean descongelados rápidamente. Este método fue desarrollado primeramente con embriones congelados de grandes animales como bovinos y ovejas. El tiempo total de congelación y descongelación es de treinta minutos menos, comparado con el Método I. La variación del término congelación "corta", fue hecho por Whittingham y col. [49], en el Método IV.

La diferencia del tiempo requerido en el proceso, entre éste y el Método I, es aproximadamente 40 minutos. El progreso más importante, desde el punto de vista del tiempo requerido en el proceso de congelación, es el que Kasai y col. [12],

TABLA I
COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES

Método	Tasa (°C/min)	Enfriamiento. Rango de Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Tasa (°C/min)	Calentamiento Tiempo (min)	Tiempo Total (min)	Referencias
I	≈0.5 >300	-5° a -70° -80° a -196°	130 <0.5	≈20	10 a 15	145	Whittingham y Colaboradores [47].
II	0.3 0.1 >300	-6° a -30° -30° a -33° -33° a -196°	80 30 <0.5	≈360	≈0.5	111	Willadsen y Colaboradores [46].
III	≈7 - 17 - >300	-5° a -20° hasta -20° -20° a -100° hasta -100° -100° a -196°	2 10 5 10 <0.5	≈360	≈0.5	28	Kasai y Colaboradores [11].
IV	0.3 >300	-9° a -40° -40° a -196°	103 < 0.5	≈500	≈0.4	104	Whittingham y Colaboradores [49].

consigue con el Método III. Este método sólo requiere cerca de 30 minutos para completar el proceso congelación-descongelación. Wood y col. [50], reportan resultados similares, con dos pasos de embriones congelados de ratones.

Sin embargo, Rall, [36], señala que el estudio de las técnicas básicas y aplicadas en los últimos 20 años, han resultado en dos métodos para criopreservación: Primero, "La Congelación lenta convencional", que proviene de investigaciones de los efectos de la tasa de congelación y descongelación en la sobrevivencia de las células de los mamíferos, [27], descrita anteriormente; y la segunda técnica, es la "Vitrificación", propuesta por Luyet [19], y aplicada recientemente por Rall [35]. Ambas requieren de un control cauteloso del volumen osmótico de los embriones durante cada paso de los procesos [36]. Esta revisión describe los métodos usados recientemente de criopreservación y las consecuencias criobiológicas del método convencional de congelación lenta versus el proceso de Vitrificación.

Haciendo notar que los estudios básicos de crioprotección y de lesiones de congelación, indican que ciertas propiedades celulares de los embriones como el tamaño y grosor, la permeabilidad al agua, los crioprotectores y otras consideraciones fisiológicas como calidad del embrión y sensibilidad tóxica al choque del frío, determinan las condiciones apropiadas para una exitosa criopreservación [17]. Estas propiedades celulares, generalmente varían, dependiendo de la especie y estado embrionario; los pasos y condiciones de la criopreservación deben ajustarse para minimizar lesiones y optimizar la sobrevivencia de embriones.

PROCESO CONVENCIONAL DE CONGELACIÓN LENTA

Tiene tres pasos principales: 1. Adición de 1 a 2 concentraciones molares de glicerol o cualquier otro criopreservador en la suspensión del embrión; 2. Controlar la congelación de la suspensión con la temperatura de congelación y almacenamiento; 3. Caracterizar la secuencia de cambios en el volumen osmótico de las blastómeras, durante el proceso de criopreservación. FIG. 5. Este proceso convencional lento, se usó con embriones de ratones de 8 días y embriones de bovinos de 7 días. A continuación, se describen las consecuencias osmóticas de cada paso:

a. Los embriones son transferidos a una solución 1,5 M de glicerol en PB1 [47]; por 20 minutos, a una temperatura de 20-25°C. Este paso produce un brusco cambio de dilatación y reducción en el volumen de los embriones, hasta que los crioprotectores penetran dentro de la célula, FIG 5. Se usaron pajuelas plásticas de 0,25 ml en el tanque de congelación preparado, por el método de una dilución [16]. Se llena una columna de 6,8 cm de sacarosa 1 M. en PB1; ésta es aspirada dentro de la pajuela seguida con aire (0,8 cm), luego solución crioprotectora (0,8 cm), aire (0,8 cm), solución crioprotectora (1 cm) y finalmente aire, hasta que la primera columna contacte con el algodón. Los embriones bovinos son aspirados dentro de la pajuela con la columna final de crioprotector, mientras que los embriones de ratones son pipeteados dentro de la pajuela preparada, finalmente la pajuela es sellada.

b. Las pajuelas son llevadas a un baño de etanol pre enfriado a -7°C, y la columna de sacarosa es inducida a formar hielo (Seeding), [16]. La pajuela se mantiene a -7°C/10 min.,

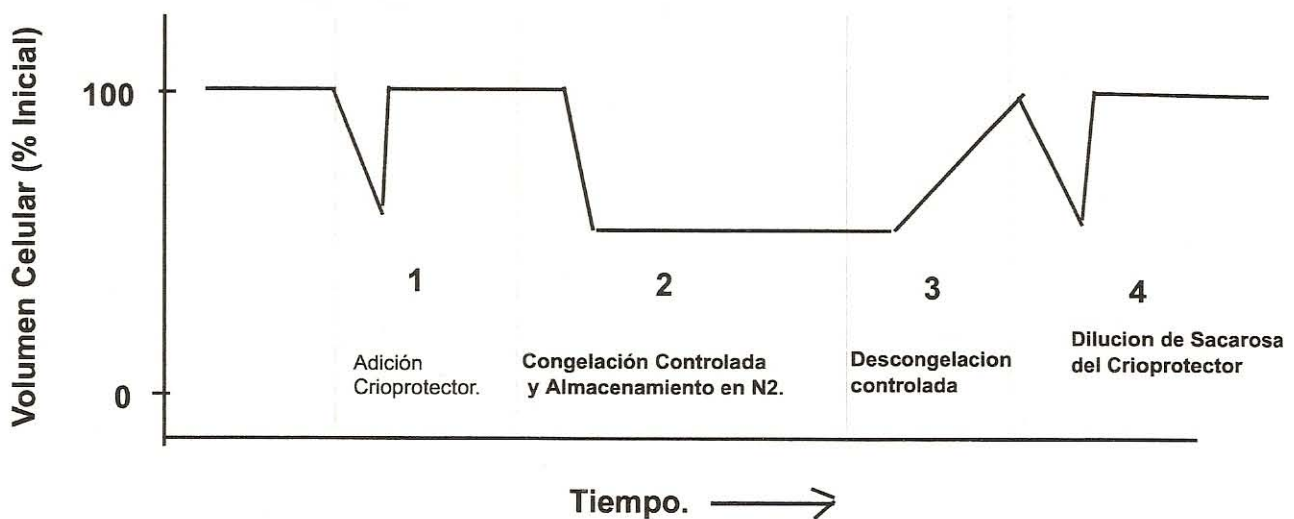


FIGURA 5. CAMBIOS DEL VOLUMEN OSMÓTICO DURANTE LA CONGELACIÓN LENTA CONVENCIONAL.

para evitar la formación de hielo dentro de la columna que contiene los embriones. Luego, el baño es enfriado a 0,4 °C/min, respectivamente, para bovinos y ratones hasta -40°C. Después de 10 minutos a -40°C, las pajuelas son transferidas dentro del nitrógeno líquido para depósito. La inducción de formación de cristales de hielo y la congelación controlada a la tasa óptima, resulta en encogimiento de los embriones, debido a la salida de agua del citoplasma (osmótico). No ocurren cambios en el volumen de las células durante la congelación rápida y el almacenamiento, FIG. 5.

c. Al final del período de almacenamiento, es descongelado a temperatura ambiente del aire por 10 segundos, y luego, sumergido en agua a 20°C por 10 segundos. La rápida descongelación reduce la osmolaridad de la solución extracelular y el derretimiento de los cristales de hielo. Las células se hinchan porque el agua fluye dentro del citoplasma, para restablecer el equilibrio osmótico, FIG. 5.

d. Inmediatamente después de la descongelación, las pajuelas son agitadas para mezclar la sacarosa con la columna de crioprotectores y luego, son incubadas en agua a 35°C, por tres minutos, luego por 20°C por 2 a 5 minutos. Las células progresivamente se encogen con los niveles de glicerol, debido a la presencia de la sacarosa impermeable, FIG. 5. Finalmente, los embriones son colectados de la pajuela y rehidratados en PB1. La remoción de sacarosa de la solución de suspensión resulta con un hinchamiento y un volumen isotónico normal [16,53].

VITRIFICACIÓN

Afortunadamente, el proceso de vitrificación tiene tres fracciones distintivas: 1. La no formación de hielo en la sus-

pensión del embrión durante la congelación, almacenamiento o descongelación; 2. Las células son osmóticamente deshidratadas previo a la congelación, por una equilibración controlada en una solución de alta concentración de crioprotectores (hasta 6 M.); 3. La secuencia característica de cambios de volúmenes osmóticos, ocurren en el embrión durante el proceso de criopreservación, FIG. 6. La vitrificación ofrece considerables premisas para simplificar y mejorar la criopreservación de células, porque no es requerido controlar la tasa de congelación con aparatos ó equipos y los daños asociados con la formación de hielo en la suspensión, es limitada [35]. La vitrificación ha sido aplicada en varias especies de embriones de mamíferos, incluyendo ratones, ganado, ovejas, conejos y ratas [36]. El proceso de vitrificación usado en laboratorio para embriones de ratón de 8 células, embriones de ovejas de 6 días y embriones de bovinos de 7 días y sus consecuencias osmóticas, son descritas a continuación:

1. Los embriones son lavados en PB1 con 6% de suero albúmina bovino (SAB), y transferido a una solución de 1,6 M. de glicerol y 6% de SAB en PB1 por 20 minutos, a temperatura ambiente. Los embriones son enjuagados en una solución de glicerol 4,2 M. y 6% de SAB en PB1, por un minuto; y luego, es puesto en la solución final de vitrificación (SV3a; 6,5 M. glicerol y 6% de BSA en PB1). Los embriones sufren una serie de cambios osmóticos en su volumen durante el proceso de equilibración, FIG. 6. Primero, el embrión sufre un transitorio cambio de encogimiento e hinchamiento de volumen en 1,6 M. glicerol; luego se encoge en la solución más concentrada de glicerol. Se usan pajuelas plásticas de inseminación, como envase de vitrificación y luego, se preparan para el método de una dilución. En resumen,

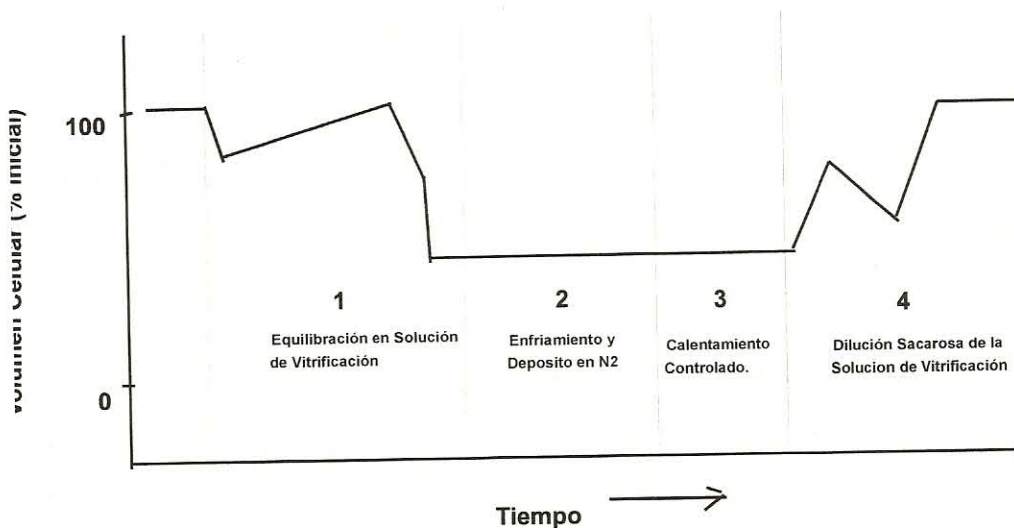


FIGURA 6. CAMBIOS DE VOLUMEN OSMÓTICO DURANTE LA VITRIFICACIÓN.

una columna de 7,5 cm de 1 M. de sacarosa en PB1, es puesto dentro de la pajueta usando una jeringa con aguja. Luego, una columna de 1 cc de solución SV3a es puesta adjunta a la columna de sacarosa, separada por un espacio de aire de 0,5 cm., con paredes secas. Embriones de bovinos y ratones son pipeteados dentro de columnas de solución de vitrificación. Finalmente, la pajueta es sellada.

2. Un minuto después de ser transferido los embriones en la solución de SV3a, las pajuelas son enfriadas transfiriéndolas en los vapores de nitrógeno líquido a -170°C (tasa de congelación $200^{\circ}\text{C}/\text{min.}$). La suspensión es enteramente vitrificada a cerca de -120°C . Las pajuelas son almacenadas en el nitrógeno líquido. Aquí no hay cambios en el volumen embrionario, debido a la congelación o almacenamiento, FIG. 6.
3. Al final del período de almacenamiento, las pajuelas son calentadas a $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ en aire por 10 segundos, y luego, sumergidas en agua a 20°C por 10 segundos, con calentamiento rápido resulta un suave cambio de suspensión viscosa a líquido. No ocurren cambios en el volumen celular durante el calentamiento, FIG. 6.
4. Inmediatamente después del calentamiento, la pajueta es agitada para mezclar la sacarosa y la columna de crioprotectores y luego, es introducida en agua a 35°C , por tres minutos; luego a 20°C por 2-5 minutos. Los embriones inicialmente se hinchan cuando se produce la mezcla de sacarosa y luego progresivamente, se va deshinchando por los niveles de glicerol del citoplasma. Finalmente, los embriones son recolectados de la pajueta y rehidratados en PB1. La remoción de la sacarosa de la solución, hace que se hinche y vuelva al volumen isotónico normal.

Ambas técnicas de criopreservación producen altas tasas similares de sobrevivencia embrionaria. Por ejemplo, una alta proporción de embriones (90% de 486 embriones) de ratón con 8 células, se desarrollan *in vitro*, con la congelación lenta convencional [34]; o por vitrificación (86% de 123 embriones), TABLA II. Los embriones de ratón de 8 células criopreservados por cualquiera de los dos métodos, resultó con altas tasas de desarrollo *in vivo* después de la transferencia. En un estudio realizado por Rall y Wood [36], el 75% de 157 embriones congelados y el 64% de 194 embriones vitrificados, se desarrollaron como fetos y nacieron vivos, luego de ser transferidos a sus madres adoptivas, TABLA II.

Resultados similares se han reportado cuando estas técnicas han sido utilizadas en embriones bovinos. Por ejemplo, una alta proporción de embriones de 7 días, se desarrollaron *in vitro*, con el método convencional lento de congelación (65% de 226 embriones, [18]; o por vitrificación (66% de 71 embriones), TABLA III. Aproximadamente, el 42% de 476 embriones bovinos congelados [17] y el 47% de 17 embriones bovinos vitrificados, establecieron preñeces después de la descongelación y la transferencia, TABLA III. Los resultados indican, que éstos métodos registran una eficiencia cerca del 80% y tasas de preñez altas, cuando se compara con la transferencia embrionaria en fresco [17].

Varias alternativas de procedimientos y soluciones de vitrificación han reportado resultados exitosos similares [23]. Un reporte reciente de una solución de vitrificación, basada en etilenglicol, puede ser especialmente apropiada para estadios tempranos de embriones, que exhiben permeabilidad limitada del glicerol [12].

A pesar de las considerables búsquedas en los últimos 15 años, ha habido poco progreso en el desarrollo de la criopreservación de oocitos [31]. El mayor éxito ha sido obtenido con ooci-

TABLA II
COMPARACIÓN DE TASAS DE PREÑEZ CON DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES DE RATÓN

	Congelación Lenta Convencional (%)	Vitrificación (%)
Embrión de ratón 8 células <i>in vitro</i>	90/486 E.	86/123 E. Rall y Colaboradores [34].
Embrión de ratón 8 células <i>in vivo post-transf.</i>	75/157 E.	64/194 E. Rall [36].

TABLA III
COMPARACIÓN DE TASAS DE PREÑEZ CON DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES DE BOVINOS

	Congelación lenta conv. (%)	Vitrificación (%)
Embrión Bovino 7 días <i>in vitro</i> .	65/226 E.	66/71 E. Leibo, [18].
Embrión Bovino 7 días <i>in vivo post-transferencia</i> .	42/476 E.	47/17 E. Leibo, [17].

TABLA IV

COMPARACIÓN DE TASAS DE PREÑEZ CON DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELACIÓN EN OOCITOS DE RATONES

Congelación Lenta Convencional

6 - 14 %
Whittingham, [48].
Glenister y Colaboradores, [8].
Schroeder y Colaboradores [40].

Vitrificación

20 - 38 %
Nakagata, [30].
Kono y Colaboradores [13].
Wood y Colaboradores [51]

TABLA V

TASA DE FERTILIZACIÓN DE OOCITOS BOVINOS VITRIFICADOS ANTES Y DESPUÉS DE LA MADURACIÓN *IN VITRO*

Grupos	Nº Oocitos Vitrificados	Nº oocitos Inseminados	Nº oocitos Fertilizados (%)
Inmaduro	244	207	-
IVM	206	196	5 (2,55)
Control	-	246	135 (54,87)

tos maduros de ratones. Sin embargo, más de 100 fetos en estado avanzado o hijos normales, se han producido de oocitos de ratón criopreservados por fertilización *in vitro* y embriones transferidos. La tasa de desarrollo, también es baja para más aplicaciones. Por ejemplo, sólo de 6 a 14% de oocitos congelados convencionalmente [48], [8], [40] y de 20 a 38% de oocitos vitrificados [13,30,51], produce fetos o hijos, TABLA IV. Esto corresponde a una eficiencia general de menos de 65% cuando es comparado con oocitos sin tratamiento. Muy poco progreso se ha producido en la criopreservación de oocitos de animales domésticos. Los fetos en etapas tardías y recién nacidos, se han reportado solo de oocitos criopreservados de conejos; pero la mayoría de la tasa de sobrevivencia fue baja (2-6%). Los oocitos de ganado exhiben una baja tasa de fertilización *in vitro*, después de una congelación lenta y poco desarrollo (0-13%) para el estado de dos células, TABLA V.

Fraciones citológicas especiales de oocitos maduros, el huso meiótico, gránulos corticales y el citoesqueleto, son considerados susceptibles a daños, durante el enfriamiento y la exposición a crioprotectores. El simple proceso de enfriamiento de oocitos de ratón [8,32], de oveja [29] y de Bovino [38] de 25 a 4°C, resulta en una despolarización del eje de los microtúbulos. Se cree que el eje se reestructura cuando los oocitos de ratón son calentados e incubados a 37°C por 60 minutos, se potencian las anomalías genéticas debido a errores en el movimiento de los cromosomas que son mayormente afectados. Sin embargo, recientes reportes indican que al menos una consecuencia de la alteración del eje meiótico anaploide, no aumenta después de la criopreservación [2]. Exposiciones a Dimetil sulfoxido también resulta con una descomposición reversible del huso o eje y la formación del Aster microtubular en los polos del huso del oocito de ratón [9] y de conejos [42].

También se ha reportado en la criopreservación de ooci-

tos, cambios estructurales en la zona pelúcida, llamado "zona de endurecimiento", que reduce la penetración del espermatozoide y la fertilización [10]. Por lo tanto, Wood y col. [50], reportan que esta zona de endurecimiento puede ser reducida o eliminada, añadiendo suero a la solución de crioprotectores. Otros efectos no definidos completamente del enfriamiento resulta en alteración de las gotas lipídicas y/o membrana celular [5].

Recientes investigaciones sugieren aproximaciones a la producción exitosa de oocitos criopreservados. Primeramente, Carroll y col. [3], reportan que el aislamiento de folículos primarios de ratones pueden ser criopreservados, madurados *in vivo* y mantenidos normales por fertilización *in vitro*. Además, dificultades técnicas durante la maduración *in vivo*, frecuentemente limitan la eficacia general (3%), esta forma puede proveer mayor número de oocitos maduros para fertilización *in vitro* u otros propósitos. Segundo, la adición de glicoproteínas anticongelantes de peces del Antártico, a la solución de vitrificación, ha sido reportado como protector de oocitos inmaduros de cerdos a daños por congelamiento [39], es decir, alrededor del 25% de oocitos de cerdos maduros vitrificados *in vitro* luego de ser descongelados. Estos resultados indican que las lesiones por congelación asociadas a la membrana, pueden ser reducidas por una nueva clase de crioprotectores extracelulares y un procedimiento de enfriamiento ultrarrápido.

APLICACIONES DE LA CRIOPRESERVACIÓN

- Almacenamiento de embriones indefinidamente.
- Mayor eficiencia para el uso de los embriones.
- Reducción del costo de mantenimiento de receptoras.

- Permite el envío de embriones a otros países.
- Aumenta la disponibilidad de nuevos mercados internacionales.
- Medio para estudio genético.
- Introducción de nuevas razas.
- Disminución de riesgos sanitarios.
- Preservación de especies animales en extinción.
- Investigación básica y aplicada de los mecanismos de criobiología.-
- Banco de embriones de ratones de laboratorio genéticamente iguales, que aseguren continua disponibilidad de variedades.
- Uso de embriones criopreservados para técnicas de fertilización *in vitro* y otras técnicas de concepción y tratamiento de la infertilidad.

CONCLUSIONES

La preservación de oocitos y embriones de mamíferos por congelación, ha progresado rápidamente desde la primera demostración en 1972. Desde el punto de vista de la criobiología y de la transferencia de embriones, las investigaciones hechas con embriones congelados ha contribuido a aportar una nueva tecnología en la Producción Animal; y es razonable pensar, que estas investigaciones y experiencias, continuarán ampliando los conocimientos de procesos biológicos fundamentales y aportarán nuevas técnicas prácticas, para aumentar la producción de los animales domésticos y definitivamente, en nuestro país es necesario desarrollar estas líneas de investigación que ayuden de cualquier forma, a una mayor eficiencia reproductiva lo cual se traducirá en una mayor producción y productividad.

Existen dos técnicas básicas de criopreservación embrionaria: la "Congelación Lenta Convencional" y la "Vitrificación". Ambas tienen procedimientos diferentes pero fines comunes: la deshidratación osmótica de la célula antes del almacenamiento en nitrógeno líquido y prevenir efectos deletéreos por químicos tóxicos en la congelación intracelular. Todavía se necesita estudiar sistemáticamente los daños moleculares y fisiológicos básicos de las células asociadas con la congelación, crioprotectores y aditivos necesarios que estabilizan los componentes frágiles de la célula.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BRACKETT, B.; SEIDEL, G.; SEIDEL, S. **New Technologies in Animal Breeding**. In: Ed. Academic Press. New York. 7: 127-139. 1981.

[2] BOS-MIKICH A.; WHITTINGHAM D.G. Parthenogenic

activation of frozen- thawed mouse oocytes. **J.Reprod. Fertil. Abstr. Ser.** 7:18. 1991.

- [3] CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R.G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **J. Reprod. Fertil.** 90: 321-327.1990.
- [4] CHUPIN, D.; PROCOREUR, R. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts: effect of number of step and of total duration. **Theriogenology** 21: 230-239.1984.
- [5] DIDION, B. A.; POMP, D.; MARTIN, M. J.; HOMANICS, G. Z.; MARKERT, C. L. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **J. Anim. Sci.** 68: 2803-2810. 1990.
- [6] ELSDEN, R. P.; SIEDEL, G. E.; TAKEDA, T.; TARRAND, G. D. Field experiments with frozen-thawed bovine embryo transferred non-surgically. **Theriogenology**, 17:1-10. 1982.
- [7] FALGE, R.; ROMMEL, P. E KAUFFOLD, P. Stand and methodon der tiergefrier conser vierung bei embryo non von saugerm. **Arch. Tierz Cht. Berlin.** 25:289-294.1982.
- [8] GLENISTER, P. H.; WOOD, M. J.; KIRBY, C.; WHITTINGHAM, D. C. Incidence of chromosomal anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. **Gametes Res.**, 16:205-216. 1987.
- [9] JOHNSON, M. H.; PICKERING, S.J. The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. **Development.** 100:313-324. 1987.
- [10] JOHNSON, M. H.; PICKERING, S. J.; GEORGE, M. A. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. **Hum. Reprod.** 3: 383-387. 1988.
- [11] KASAI, M.; NIWA, K.; IRITANI, A. Cryobiology. **J. Reprod. Fertil.** 59: 51-56. 1980.
- [12] KASAI M.; KOMI, J. H.; TAKAKAMO, A.; TSUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **J. Reprod. Fertil.** 89: 91-97.1990.
- [13] KONO, T.; KWON, O. Y.; NAKAHARA, Y. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. **Cryobiology.** 28: 50-54. 1991.
- [14] LEHN-JENSEN, H.; GRAVE, T. Low temperature preservation of cattle blastocysts. **Theriogenology.** 9: 313-322. 1978.
- [15] LEIBO, P.; MAZUR, P. **Methods in mammalian reproduction.** J.C. Daniel Jr., Academic Press Ed. 1ª Ed. New York: 179-201. 1978.

- [16] LEIBO, S.P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**. 21: 767-790. 1984.
- [17] LEIBO, S.P. Cryobiology: **Preservation of mammalian embryos**. In: J.W. Evans and A. Hollander Ed. Genetic Engineering of Animals. 1^o Ed. Plenum, New York: 251-272. 1986.
- [18] LEIBO, S.P. Cryopreservation of embryos. In: **Proceeding of the 11th International Conference on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. Dublin, Ireland. 5: 370-377. 1988.
- [19] LUYET, B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. **Biodynamic**. 1 (39): 1-14. 1937.
- [20] MARIANA, J.C.; MACHADO, L. Etude de la formation de l'antrum dans les follicules de l'ovaire de rates et de vache normales an stimulés par PMSG. **Anm. Bioch. Biophys**. 16: 545. 1976.
- [21] MASSIP, A.; MULNARD, J. Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. **J. Reprod. Fertil**. 58: 475-478. 1980.
- [22] MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; HENZEN, C.; ECTORS, F. Fast freezing of cow embryos in French straws with an automatic programs. **Theriogenology**. 18: 325-332. 1982.
- [23] MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Pregnancies following transfers of cattle embryos preserved by vitrification. **Cryo-letter**. 7: 270-273. 1986.
- [24] MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**. 27: 69-79. 1987.
- [25] MAZUR, P. Cryobiology. **J. Gen. Physiol**. 47: 347-369. 1963.
- [26] MAZUR, P. **Cryobiology**. H.T. Meryman. Ed. Academic Press. 1^o Edt. New York: 213-315. 1966.
- [27] MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, J. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp. Cell Res.**, 71: 345-355. 1972.
- [28] MIYAMOTO, H.; ISHIBASHI, T. Cryobiology. **J. Reprod. Fertil**. 54: 427-432. 1978.
- [29] MOOR R.M.; CROSBY, I.M. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. **J. Reprod. Fertil**. 75: 467-473. 1985.
- [30] NAKAGATA, N. High survival rate of fertilized mouse oocytes after vitrification. **J. Reprod. Fert**. 87: 479-483. 1989.
- [31] PARKS, J.E.; RUFFING, N. A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology**. 37: 59-73. 1992.
- [32] PICKERING, S.J.; JOHNSON, M.H. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocytes. **Hum. Reprod**. 2: 207-216. 1987.
- [33] POLGE, H. Freezing eggs and embryos of farm animals. **Cryobiology**. 15: 370-373. 1948.
- [34] RALL, W.F.; MEYER, T.K.; LEIBO, S.P. Effect of warning conditions on the survival of mouse embryos cryopreserved by a one-step straw procedure. **Theriogenology**. 25: 186. 1986.
- [35] RALL, W.F. Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos. **Cryobiology**. 24: 387-402. 1987.
- [36] RALL, W.F. Cryopreservation of embryos and oocytes: Methods and applications. **Animal Reprod. Sci**. 28: 237-245. 1992.
- [37] RENARD, J.P.; OZIL, J.P.; HEYMAN, Y. Cervical transfer of deep frozen cattle embryos. **Theriogenology**. 15: 311-320. 1981.
- [38] RICHARDSON, R.; PARKS, J.E. Effects of chilling on the meiotic spindle and chromosomes of bovine oocytes. **Theriogenology**. 37: 284. 1992.
- [39] RUBINSKI, B.; ARAV, T.; DEVRIES, A.L. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. **Cryo-letters**. 12: 93-106. 1991.
- [40] SCHROEDER, A.C.; CHAMPLIN, A.K.; MOBRAATEN, L.E.; EPPIG, J.J. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. **J. Reprod. Fert**. 89: 43-50. 1990.
- [41] SMITH, A.V. *In vitro* rabbit eggs. In: **Mamalian germ cells**. Wolstenholme G.E.M. Cameron M.P., Freeman J.C Edit. 1^o Ed. 217-225. 1953.
- [42] VINCENT, C.; GARNIER, V.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Solvent effects on cytoskeletal organization and *in vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. **J. Reprod. Fert**. 87: 809-820. 1989.
- [43] WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Vitrification of bovine oocytes before and after maturation *in vitro*. **Proceeding of the 12th., International Congress on Animal Reproduction**. 3: 1499-1501. 1992.
- [44] WILMUT, I.; ROWSON, L.E.A. Experiments on the low temperature preservations of cow embryos. **Vet. Rec**. 92: 636-690. 1973.
- [45] WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. The effect on cow embryos of cooling to 20 and 196 °C. **J. Reprod. Fertil**. 45: 409-411. 1975.
- [46] WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Deep freezing of cow embryos. **J. Reprod. Fert**. 52: 391-393. 1977.
- [47] WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival

- of mouse embryos frozen to -196 and 269 °C. **Sci. New York.** 178: 411-414. 1972.
- [48] WHITTINGHAM, D.G. Fertilization in vitro and development to term of infertilized mouse oocytes previously stored at -196 °C. **J. Reprod. Fert.** 49: 89-94. 1977.
- [49] WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.; FARRANT, J.; LEE, H.; HALSEY, J.A. **J. Reprod. Fert.** 56: 11-21. 1979.
- [50] WOOD, M.J.; CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D.G. The addition of serum to the medium limits zona hardening in frozen oocytes. **J. Reprod. Fert. Abstr. Ser.3:** 33. 1989.
- [51] WOOD, M.J.; CARROLL, J.M.; CANDY, C. Cryopreservation of mouse oocytes by vitrification. **J. Reprod. Fert. Abstr Ser.** 7: 29. 1991.
- [52] BETTERIDGE, K. J. Embryo Transfer in Farm Animals. A Review of Techniques and Applications. **Agriculture Canada.** Monograph 16: 1-9. 1977.
- [53] ROA, N. Relación entre Concentraciones de Progesterona y la Tasa de Preñez en Receptoras de Embriones Bovinos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. (Tesis de Magister Scientiarum). Maracay, Venezuela: 1-106. 1996.
- [54] SHIMOHIRA, I. Embryo Transfer (ET) and its related techniques in Japan. **Proceeding of 1st East Asian Symposium on Animal Biotechnology.** Sendai, Japan. Vol. 1:27-33. 1995.