

# **UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“SITUACIÓN ACTUAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES  
BOVINOS”**

**MONOGRAFÍA**

POR

**VÍCTOR MANUEL DE LA CRUZ HERNÁNDEZ**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO.

DICIEMBRE DEL 2014.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



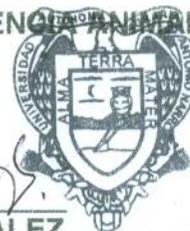
“SITUACIÓN ACTUAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES  
BOVINOS”

Monografía Aprobada por el

**ASESOR PRINCIPAL**

MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“SITUACIÓN ACTUAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES  
BOVINOS”

MONOGRAFÍA APROBADA POR EL H. JURADO EXAMINADOR

  
MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ

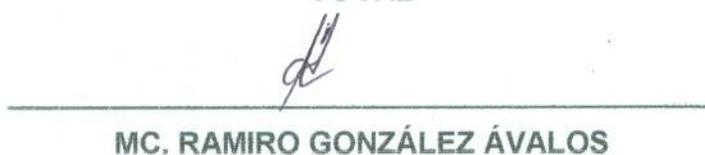
PRESIDENTE

  
DR. CARLOS LEYVA ORASMA

VOCAL

  
DR. FRANCISCO GERARDO VÉLIZ DERAS

VOCAL

  
MC. RAMIRO GONZÁLEZ ÁVALOS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2014

## DEDICATORIAS

### A MIS PADRES

#### **Gilibardo De La Cruz Hernández y Margarita Hernández Bautista.**

Por su amor, cariño y comprensión, por tantos ejemplos de vida, y por esa perseverancia en seguir creyendo y depositando esa confianza de convertirme en una persona de bien y por el apoyo incondicional que hicieron a que las cosas sean más fáciles aun sin estar a su lado y porque me dieron el regalo maravilloso que es la vida y compartir risas y tristezas con una bonita familia que formaron y por haberme acompañado en este largo camino para que este día llegara y porque sé que lo seguirán haciendo en todo momento. Gracias, los Amo.

### A MIS HERMANAS

#### **Ana Karina De La cruz Hernández y Nancy De La cruz Hernández.**

Por el apoyo incondicional y por esas palabras de aliento y de ánimo durante toda mi carrera y, por hacerme ver que las cosas buenas son difíciles pero nunca imposibles de lograrlas, y con ellas quiero compartir cada uno de mis logros. Gracias, las llevo siempre en mi corazón.

### A MIS ABUELOS

En especial a mi abuela **Salomé**, gracias por todo el apoyo y esas palabras tan sabias y aunque mis otros abuelos ya no estén conmigo viendo mis logros, siempre los llevaré en mi corazón en donde quiera que se encuentren.

### A MIS TÍOS Y PRIMOS

Porque siempre me apoyaron moralmente en los momentos que más lo necesité y por esas palabras de aliento que fueron muy importantes para seguir adelante. En especial a **Miguel Ángel, Juan Antonio y Azalia.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios** y a la vida por haberme permitido llegar hasta estos momentos, por cuidarme y brindarme salud en todo momento, y en especial en cada una de estas etapas de mi formación profesional en la universidad. GRACIAS SEÑOR.

### **A MI ALMA MATER**

Por darme la formación profesional necesaria para enfrentar los problemas de la vida profesional.

Gracias a UAAAN UL por haberme dado esa oportunidad de estar dentro de ella sin importar el lugar de donde soy y permitirme formarme como profesionista, gracias por abrirme las puertas de su hogar y así lograr mis sueños y por formar parte de mí ahora ALMA TERRA MATER.

### **A MIS ASESORES**

MC. Juan Luis Morales Cruz, Dr. Carlos Leyva Orasma, Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras, MC. Ramiro González Ávalos. Por la orientación y ayuda que me brindaron para la realización de este trabajo, por su apoyo y amistad que permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto.

Gracias a todos mis maestros por los conocimientos y consejos compartidos dentro y fuera de las aulas y la dedicación de formarme como profesionista.

### **A MIS AMIGOS(A)**

A todos mis amigos(a) y compañeros(a) de la carrera, en cada uno de ustedes hay una persona muy especial. He aprendido y disfrutado con ustedes mis horas de estudio, gracias por la ayuda cuando en ocasiones me he sentido solo y perdido, gracias por esa bonita amistad sincera.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIAS</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>VII</b>
<b>I. OBJETIVO</b>	<b>VIII</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>2</b>
3.1. TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES.	2
3.2. TIPOS DE CRIOPROTECTORES.	4
3.3. CURVAS DE ENFRIAMIENTO Y CAMBIOS CELULARES DURANTE LA CONGELACIÓN.	9
3.4. ESTADÍOS EMBRIONARIOS RECOMENDADOS PARA LA CONGELACIÓN.	14
3.5. VENTAJAS DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES.	18
3.6. RESULTADOS DE FERTILIDAD CON EMBRIONES FRESCOS VS CONGELADOS.	19
3.7. RESULTADOS DE INVESTIGACIONES ACTUALES EN EL ESTADO DE COAHUILA.	21
3.8. AVANCES SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN.	23
	<b>III</b>

3.9. VITRIFICACIÓN.	25
3.9.1. VENTAJAS DE LA VITRIFICACIÓN.	26
3.9.2. TÉCNICAS DE VITRIFICACIÓN.	28
<b>IV.- CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>V.- RECOMENDACIONES</b>	<b>30</b>
<b>VI.- LITERATURA CITADA</b>	<b>31</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> EMPAJILLADO DEL EMBRIÓN CON GLICEROL Y ETILENGLICOL.	7
<b>FIGURA 2:</b> EQUILIBRIO OSMÓTICO Y FORMACIÓN DE CRISTALES EN LA CONGELACIÓN.	10
<b>FIGURA 3:</b> MÓRULA COMPACTA Y BLASTOCISTO EXPANDIDO	14
<b>FIGURA 4:</b> MÓRULAS COMPACTAS.	15
<b>FIGURA 5:</b> BLASTOCISTO TEMPRANO.	15
<b>FIGURA 6:</b> BLASTOCISTO MADURO.	16
<b>FIGURA 7:</b> EMBRIONES BOVINOS DE EXCELENTE CALIDAD.	23
<b>FIGURA 8:</b> BLASTOCISTOS Y MÓRULAS VISTOS DESDE UN ESTEROMISCROSCOPIO.	23
<b>FIGURA 9:</b> EMBRIONES LISTOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN.	24
<b>FIGURA 10:</b> PASOS EN LA VITRIFICACIÓN DE UN EMBRIÓN BOVINO.	29

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1:</b> FACTORES ASOCIADOS CON LA CRIOPRESERVACIÓN QUE CONTRIBUYEN AL DAÑO Y MUERTE CELULAR EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	13
<b>CUADRO 2:</b> TASA DE PREÑEZ DE ACUERDO AL TRATAMIENTO RECIBIDO POR EL EMBRIÓN ANTES DE LA T.E. 20	
<b>CUADRO 3:</b> TASA DE PREÑEZ DE EMBRIONES FRESCOS VS CONGELADOS	21
<b>CUADRO 4:</b> TASA DE GESTACIÓN DE LAS HEMBRAS RECEPTORAS DE ACUERDO AL TIPO DE EMBRIÓN RECIBIDO (SEXADO Y NO SEXADO)	22
<b>CUADRO 5:</b> EFECTO DE LA CALIDAD DEL C. L. SOBRE LA TASA DE GESTACIÓN DE VAQUILLAS BRADFORD QUE RECIBIERON UN EMBRIÓN CONGELADO	22

## **RESUMEN**

El objetivo de esta revisión es brindar información sobre las diferentes técnicas de criopreservación de embriones bovinos, analizando algunas de las ventajas y desventajas de cada una de ellas en lo que respecta a su realización y porcentajes de preñez.

El uso de la criopreservación de embriones ha tenido un gran avance dentro de la transferencia de embriones, es una herramienta que brinda muchas ventajas en los trabajos de mejoramiento genético en la actualidad. Es de suma utilidad, ya que a través de esta técnica podemos conservar durante un prolongado periodo un embrión de excelente calidad, que a la par nos permite utilizarlo cuando y donde se produzcan las condiciones favorables para lograr así la preñez de las receptoras, o aun mejor, estos embriones criopreservados se pueden usar en algún lugar lejano de donde fue colectado.

En la actualidad los métodos de criopreservación ya cuentan con equipos programables, que realizan parte del proceso automáticamente ya sea utilizando diferentes programas y productos para la criopreservación. De tal manera que la congelación adecuada de embriones permite el intercambio comercial entre países, de acuerdo a las regulaciones sanitarias establecidas, también facilita y abarata los costos de transporte, brindando así beneficios de un material genético altamente valioso y de calidad para los productores.

**Palabras clave:** Embriones, Criopreservación, Etilenglicol, Glicerol, Vitricación.

## **I. OBJETIVO**

La finalidad de este trabajo es describir los diferentes métodos actuales de criopreservación de embriones bovinos. De tal manera que se identificaran los principales cambios durante el proceso de congelación (criopreservación) de embriones bovinos.

## II. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 40 años las células y embriones de mamíferos se han conservado a temperatura ambiente, a temperatura de refrigeración y por los diferentes métodos de crioconservación. En la actualidad se sabe que estas técnicas se han convertido en los procedimientos más sencillos, prácticos y menos costosos de congelación.

Según Landinez y col. (2007), en los últimos años, la criopreservación de embriones y ovocitos ha sido una herramienta útil para interrumpir y controlar el ciclo reproductivo de especies de interés zootécnico, sometiendo dichos embriones y ovocitos a temperaturas bajas, manteniendo así su ciclo celular, conservando su viabilidad y funcionalidad.

Celestinos y Gatica (2002) mencionan que en los registros de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones revelan que más del 50% de 500.000 embriones de bovino transferidos en los últimos años han sido usados después de ser congelados y descongelados.

Este trabajo tiene como objetivo revisar los presentes métodos de criopreservación de embriones bovinos, así como también hablar de los últimos procedimientos y avances para que los nuevos investigadores puedan tener una revisión actualizada de literatura para iniciar sus nuevos trabajos y así poder enfocarse en ciertos puntos para realizar la criopreservación de embriones.

También se abordarán resultados de estudios recientes hechos en el extranjero, en México y particularmente en la zona del estado de Coahuila, con el propósito de hacer comparativos y dar divulgación a dichos resultados.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Técnicas de criopreservación de embriones.

La criopreservación o crioconservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (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 mucho tiempo, a esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirán la muerte de una célula, quedan efectivamente detenida, explica (Teodoro, 2011).

Por su parte Medeiros y col. (2002) mencionan que el objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un periodo prolongado de tiempo.

La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso, 2001). La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico-químicas favorables para la supervivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1984).

Durante muchos años fue imposible congelar con éxito los embriones de mamífero, ya que su gran tamaño impedía que los diferentes procedimientos de congelamiento pudiera evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, los cuales resultan letales (Martínez, 2006).

Con el desarrollo de biotecnologías en la reproducción, entre las principales que destacan son la superovulación, fecundación *in vivo* o *in vitro* y micro manipulación de embriones, a todo esto 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 así mantener y mejorar la especie maximizando las capacidades genéticas de la misma (Guerra y col. 2012).

Giraldo y col. (2012) mencionan que durante los últimos 20 años, se ha observado que la producción de embriones bovinos ha crecido de forma progresiva, en especial, en el área de la producción *in vitro* (PIV).

Por su parte Belascoain y col. (2010) mencionan que el proceso de criopreservación se clasifica en equilibrado y no equilibrado, según se utilicen las técnicas que logren o no un equilibrio osmótico entre el medio y el agua intracelular antes de la congelación del embrión. Por su parte describe los dos tipos de criopreservación y de acuerdo a ellas menciona que dentro de la criopreservación en equilibrio se encuentra la técnica tradicional con tres variantes: estándar, de un paso y transferencia directa.

El mismo autor menciona que en la primera el tiempo de exposición al crioprotector es de diez a treinta minutos; siendo una técnica relativamente lenta al igual que las otras dos variantes, su mayor desventaja es el tiempo requerido para la descongelación ya que se necesitan hacer pasajes por soluciones con distintas concentraciones de glicerol y sucrosa, haciendo esto también elevar su costo. Siguiendo la clasificación dentro de la variante de un paso el tiempo requerido para la descongelación es menor, la desventaja es que muchas veces no se logran homogenizar correctamente las soluciones contenidas en la pajuela, haciendo esto variables los porcentajes de preñez.

De la misma manera Belascoain y col. (2010) de acuerdo a esta clasificación mencionan que en la transferencia directa se requiere menor tiempo de exposición al crioprotector que en la estándar; mientras tanto la descongelación es más rápida no requiriendo el pasaje por las distintas soluciones, haciendo también esto disminuir los costos de dicha técnica. Los porcentajes de preñez son similares a los de la estándar por otra parte también describe que en la criopreservación no equilibrada hay mayor deshidratación y penetración del crioprotector previo al enfriamiento, lo que las hace más rápidas que las equilibradas. Belascoain y col. (2010) mencionan que dentro de esta hay dos variantes: rápida y vitrificación. En la primera los porcentajes de preñez son bajos comparados con las demás

técnicas. En la vitrificación los porcentajes de preñez son aun variables, por estar todavía en desarrollo, pero en algunos casos similares a la técnica estándar.

La congelación ultrarrápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson (1986). Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, seguida de la inmersión en nitrógeno líquido.

De ante mano se sabe que en la actualidad hay sustancias o agentes en la naturaleza, que tienen la propiedad de disminuir (no eliminar), la acción deletérea del efecto solución cuando sometemos al embrión a una disminución de temperatura; son los llamados agentes crioprotectores.

Martínez (2006) menciona también sea cual fuere el método empleado, la criopreservación involucra la exposición inicial de las muestras al crioprotector, el congelamiento a temperatura por bajo de cero, el almacenamiento, el descongelamiento, y finalmente, la remoción del crioprotector, con el retorno al ambiente fisiológico, lo cual permitirá el desarrollo posterior, la condición fundamental es que las células mantengan su integridad estructural a lo largo de todo el procedimiento.

### **3.2. Tipos de crioprotectores**

Según Melendres (2012) existen dos tipos de crioprotectores:

#### **a) Permeables o Intracelulares.**

De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma. Miyaque y col. (1993) exponen que estos crioprotectores se han usado por que deshidratan la célula penetrando para ayudar a proteger el citoplasma. Por su parte otros autores como son Sommerfeld y Niemann (1999),

menciona que el crioprotector más utilizado en los procedimientos de vitrificación es el Etilenglicol, ya que este crioprotector tiene mayor permeabilidad y relativa baja toxicidad sobre las células, haciendo una comparación con otros compuestos crioprotectores, tal es el caso del Glicerol y el Propilenglicol (Palasz y Mapletoft, 1996); mas sin embargo altas concentraciones de estos compuestos no son recomendables, ya que pueden tener efectos toxicos e hipertónicos. Otro autor, tal es el caso de Visitin y col. (2002) mencionan que cuando se utiliza una concentración de 3,6 Molar (M) de EG, las tasas de viabilidad son similares entre los embriones vitrificados y embriones no congelados; sin embargo, cuando se aumenta a 7,2 M, la concentración de EG, se presenta toxicidad de la célula embrionaria.

#### **b) Impermeables o Extracelulares.**

De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructuosa ficol, dextrano sorbitol, sacarosa, lactosa, trealosa, entre otros, estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivas para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones durante el equilibrio.

Su mecanismo de acción consiste en estimular osmóticamente una rápida deshidratación celular y de esta manera disminuir el volumen de agua intracelular que podría formar cristales de hielo (Medeiros y col. 2002).

Existen distintos métodos de criopreservación y de acuerdo a ello podemos clasificarlos en la velocidad de congelamiento y descongelamiento; en protocolos de congelación lenta-descongelación lenta, congelación lenta-descongelación rápida en las cuales la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable. Por lo tanto la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura

ambiente o en un baño de agua a 30 °C para así evitar la re cristalización (Ávila y col. 2006).

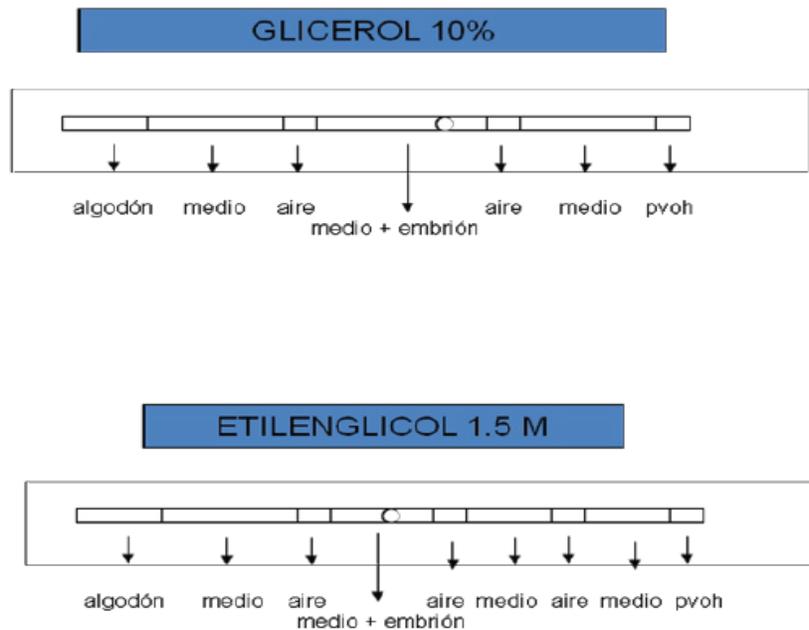
Por su parte en un trabajo realizado por Gil (2011) menciona que los protocolos de criopreservación se han clasificado como “lentos o rápidos”, de acuerdo con la velocidad de enfriamiento y el tipo de concentración de los crioprotectores usados.

En un estudio realizado por Guerra y col. (2012), luego de la clasificación de los embriones obtenidos ya sea por procedimientos *in vivo* o *in vitro*, mencionan que utilizaron tres protocolos de congelación, la primera de congelación lenta y dos de vitrificación. En los resultados destacan que los protocolos de congelación lenta ensayados en su investigación tuvieron una mayor efectividad que los de vitrificación tanto para embriones producidos en vivo como in vitro.

Actualmente, los métodos más utilizados para criopreservar embriones son la congelación convencional y la vitrificación. La primera es considerada la técnica de elección para la criopreservación de embriones bovinos producidos in vivo. Se destaca que en este tipo de embriones, la congelación convencional ha permitido obtener resultados satisfactorios y muy poca diferencia a embriones frescos (Mucci y col. 2006)

Por otro lado Hernández (2013) menciona que se ha incrementado el procedimiento de dos técnicas de congelación de embriones, los cuales se usan el Glicerol y el Etilenglicol como crioprotectores (el último es el más usado en la actualidad) el cual fue desarrollado recientemente como técnica de transferencia directa, es decir, que se permite transferir el embrión desde la misma pajuela en la que fue congelado (Martínez, 2006). En este apartado se identifican los procedimientos para introducir el embrión en la pajilla de acuerdo al crioprotector utilizado. Solo varía el número de columnas del medio en cada pajilla, con G (3 columnas de medio y 2 espacios de aire) y con EG (4 columnas de medio y 3 de aire).

## Ejemplo del empajillado del embrión con glicerol o etilenglicol



**Figura 1: Empajillado del embrión con glicerol y etilenglicol, Hernández (2013).**

### Técnica de congelación con Glicerol

- Medio comercial con Glicerol al 10% (1.5M).
- Colocar el embrión identificándolo adecuadamente en la pajilla, sellar la pajilla.
- Esperar 10 a 25 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar la pajilla en la congeladora a  $-6^{\circ}\text{C}$  (2 minutos).
- Realizar la inducción de la cristalización (seeding) a  $-6^{\circ}\text{C}$ , en la columna donde se localiza el embrión.
- Etapa de equilibrio post-cristalización (10 minutos).
- Iniciar la congelación a un ritmo de  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  hasta llegar a los  $-32^{\circ}\text{C}$ , al llegar a esta temperatura mantener los embriones durante 5 minutos.
- Inmersión directamente de las pajillas en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

- Almacenamiento de las pajillas en termo de nitrógeno líquido.

### **Técnica de congelación con Etilenglicol**

- Medio comercial con EG al 1.5 M.
- Colocar el embrión en la pajilla identificándolo adecuadamente, sellar la pajilla.
- Esperar máximo 10 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar la pajilla en la congeladora a - 7°C (2 minutos).
- Realizar la inducción de la cristalización (seeding) a - 7°C, en la columna donde se localiza el embrión.
- Etapa de equilibrio post-cristalización (10 minutos).
- Iniciar la congelación a un ritmo de -0.3 o 0.5°C/ minuto hasta llegar a los - 32°C, al llegar a esta temperatura mantener los embriones durante 5 minutos.
- Inmersión directamente de las pajillas en nitrógeno líquido (-196°C).
- Almacenamiento de las pajillas en termo de nitrógeno líquido (Hernández, 2013)

Por otro lado De Luca (2002) describe el método "ONE STEP" de crioconservación embrionaria en bovinos de una manera más detallada:

1. Selección del embrión. Separar mórulas de blastocistos.
2. Lavar 10 veces con una solución de Dulbecco® modificado, con 10% de suero fetal bovino.
3. Mórulas: sumergir durante 10 minutos el embrión en una solución de Dulbecco®, con 1,5 molar de glicerol, más 0,1 molar de sucrosa.  
Blastocistos: sumergir durante 10 minutos el embrión en una solución de Dulbecco®, con 1,5 molar de glicerol, más 0,2 molar de sucrosa.

4. Tomar una pajilla de 0,25cc y cargar en ella el embrión en el siguiente orden:
  - a) Primera columna de Dulbecco® con suero fetal al 10%.
  - b) Segunda columna, pequeña burbuja de aire.
  - c) Tercera columna de Dulbecco® con medio de congelación.
  - d) Cuarta columna, pequeña burbuja de aire.
  - e) Quinta columna, cargar el embrión en su medio.
  - f) Sexta columna, pequeña burbuja de aire.
  - g) Completar el resto de la pajueta con medio de congelación.
5. Llevar los embriones a la congeladora con una temperatura de entre -6°C a -7°C, donde permanecerán 10 minutos en stand by, hasta alcanzar los -35°C.
6. A su término tocar la pajueta a la altura de la 3ra. columna con una pinza hemostática, previamente sumergida en nitrógeno líquido para que alcance en su extremo los -196°C. Este método (Seeding) evitará la muerte del embrión por sobrefusión.
7. La corrida de temperatura será de 0,5°C por minuto hasta alcanzar los -35°C, momento en que se introducirá la pajueta en nitrógeno líquido (Plunging).

### **3.3. Curvas de enfriamiento y cambios celulares durante la congelación.**

Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. Por lo tanto la cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el

nombre de criocentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001).

Según De la Fuente (2009) menciona los principales mecanismos de daño celular durante la criopreservación:

- Formación de cristales de hielo
- Daño osmótico
- Efecto tóxico del crioprotector
- Fractura de la zona y del embrión
- Daño en las organelas intracelulares
- Ruptura de los contactos entre células

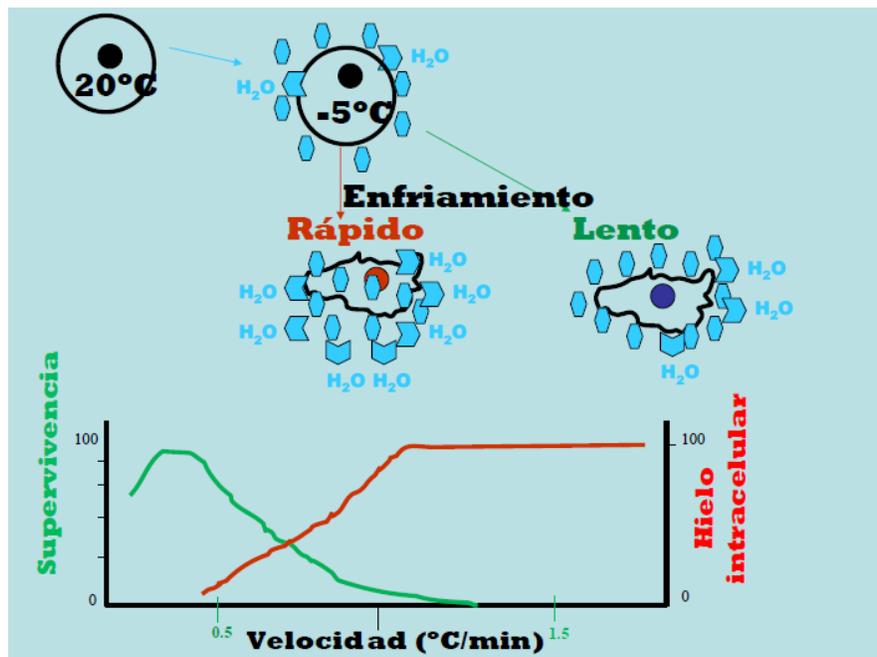


Figura 2: Equilibrio Osmótico y formación de cristales en la congelación (De la Fuente, 2009).

Mucci y col. (2006) también mencionan que durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intra o extracelular que disminuyen la sobrevivencia poscriopreservación.

Grossmann y Santaló (1991) dicen que punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente, por lo tanto cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero, 1985). Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células (Boiso, 2001). El mismo autor menciona que la velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente. Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984).

La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular (Holt, 2000). También la velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar y Col. 2003). Mazur (1984) postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse también por la acción combinada de factores físicos. Los factores físicos a los que se refiere son el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo.

Sin embargo esta presión produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Ávila y col. 2006).

Por su parte Izaguirre (2012) menciona los principales cambios y daños que produce la criopreservación en general para ello podemos hablar de tres tipos de daño en tres rangos de temperatura diferentes:

- De +15°C a -5°C: las lesiones por enfriamiento, implican cambios en ciertas estructuras como gotas lipídicas, membranas ricas en lípidos y estructuras como microtubulos y microfilamentos del citoesqueleto. Se trata de alteraciones parcialmente irreversibles y a las que los embriones bovinos son relativamente resistentes.
- De -5°C a -80°C: los daños ocurren sobre todo en el rango de -5°C a -40°C. Es el momento en el que ocurre la formación de hielo extra e intracelular, ya indicada anteriormente como la mayor fuente de lesión. Producen efectos deletéreos, mayormente mecánicos, sobre todas las estructuras.

- De -50°C a -150°C: debido al efecto mecánico de la solución solidificada, hay un elevado riesgo de rotura de la zona pelúcida (ZP).

No obstante la fase de almacenamiento a temperaturas inferiores a -150°C (normalmente a -196°C) es la menos peligrosa, sin embargo, el calentamiento accidental durante la misma es una de las causas más frecuentes de daños, por lo que el manejo de las muestras una vez introducidas en el nitrógeno líquido debe ser especialmente cuidadoso para que no se pierda la cadena de frío Izaguirre (2012).

Además, entre más pequeña es la muestra, más posibilidades de supervivencia presenta, característica que concede cierta ventaja a los embriones en estadio de blastocisto, formados por células muy pequeñas, frente a los ovocitos, cigotos y embriones en estadios tempranos.

**Cuadro 1: Factores asociados con la criopreservación que contribuyen al daño y muerte celular en los sistemas biológicos, Báez y Villamediana, 2008**

<b>Sistema</b>	<b>Tipo / Causa del Daño</b>
<b>Todo</b>	Formación de hielo intracelular y extracelular, apoptosis, toxicidad, metabolismo general.
<b>Membrana</b>	Ruptura
<b>DNA</b>	Apoptosis
<b>Citoesqueleto</b>	Microtubulos disueltos
<b>Proteínas/enzimas</b>	Deshidratación, pérdida de sus funciones
<b>Zona pelúcida</b>	Gránulos corticales, zona pelúcida
	Endurecimiento, fracturas

### 3.4. Estadíos embrionarios recomendados para la congelación.

Las autoras Filipiak y Larocca (2012) afirman que se debe tener en cuenta que para someter a los embriones a las diferentes técnicas de criopreservación estos deben ser mórulas compactas o blastocistos de buena calidad o excelente calidad, los cuales deberán estar entre los días 6 y 8 de vida.



**Figura 3: Mórula compacta y blastocisto expandido, Filipiak y Larocca (2012)**

Por su parte Martínez (2009) menciona también los estadios embrionarios recomendados para la criopreservación en una forma detallada de acuerdo a la morfología que presentan dichas células en su respectiva edad, entre los cuales se encuentran los siguientes:

1. Mórula compacta. Debido a la compactación, las uniones de los blastómeros han formado una masa celular, de manera que ya no se aprecian los blastómeros individuales. El embrión ocupa de 60% a 70% del espacio perivitelino.



**Figura 4: Mórulas compactas, Martínez (2009)**

2. Blastocisto temprano. En la masa celular aparece una pequeña cavidad llena de líquido llamado blastocele. Aquí las células empiezan a diferenciarse. El embrión ocupa de 70% a 80% del espacio perivitelino.



**Figura 5: Blastocisto temprano, Martínez (2009)**

3. Blastocisto maduro. La diferenciación continua, observándose las células del tabique embrionario o disco embrionario, que origina al embrión y a las células del trofoblasto. El embrión tiene apariencia de anillo y ocupa el 90% del espacio perivitelino.



**Figura 6: Blastocisto maduro, Martínez (2009)**

Otros autores mencionan que para obtener los mejores resultados, es importante tener en cuenta el sistema de clasificación, basado en la calidad y el estado de desarrollo del embrión que va a ser transferido. Según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), los estados de desarrollo están clasificados así: 1. No fecundado; 2. Dos a doce células; 3. Mórula temprana; 4. Mórula; 5. Blastocisto temprano; 6. Blastocisto; 7. Blastocisto expandido; 8. Blastocisto eclosionado y 9. Blastocisto eclosionado expandido. Por calidad de los embriones los clasifica por código así: Código 1. Excelente o bueno; Código 2. Regular; Código 3. Malo; y Código 4. Muerto / degenerado (Stingfellow, 2000, citado por Duica y col. 2007).

También otro autor destaca que es de suma importancia el resaltar el hecho de que solo los embriones de excelente calidad y con el grado de desarrollo normal son los adecuados para ser sometidos al proceso de congelación, ya que otras categorías ofrecen unos porcentajes de gestación inferiores e incluso nulos (De la Fuente, 2004).

No obstante, Cutini y col. (2000) menciona que la calidad embrionaria de transplante es muy importante, pero se debe tomar en consideración que embriones calificados excelentes luego de ser transferidos normalmente, no terminan en preñez, mientras que embriones de buena calidad y transferidos con algún tipo de problema de desarrollo, resultan en preñeces y nacimientos normales. Por lo tanto esto nos indica que la calidad de embriones pueden

determinar los resultados, pero existen otros factores relacionados con la receptora o con la transferencia que pueden también modificar dichos resultados.

Por otro lado, la transferencia de embriones de 9 días o más, no se realiza, pues es dificultoso encontrar los embriones en el medio de lavaje luego que los mismos han perdido la zona pelucida.

Martín y Monge (2012) mencionan que en un trabajo realizado con embriones equinos la calidad del embrión recuperado es también de suma importancia, ya que sólo son aptos para la congelación los embriones de grado I (excelente) o grado II (bueno), según la clasificación de Mckinnon y Squires. Estudios demuestran que los mejores resultados se obtienen cuando se congelan mórulas o blastocistos tempranos, con un diámetro medio de 200  $\mu\text{m}$  ( $\leq 300 \mu\text{m}$ ), carentes de blastocele y sin cápsula glicoproteica que lo rodea, ya que estas características tienen mucha importancia en el proceso de congelación y descongelación, por que los cambios de volumen del embrión, la cantidad de agua y la permeabilidad a los crioprotectores varía enormemente a medida que el embrión se va desarrollando.

Los mismos autores mencionan que cuando se congelan mórulas o blastocistos tempranos, el 80% de los embriones recuperados son viables tras la descongelación, obteniéndose unos índices de preñez del 50-60%, incluso pudiendo llegar al 86%. Los embriones más grandes (blastocisto y blastocisto expandido) no toleran bien el proceso de congelación-descongelación, producto de un mayor índice de muerte celular y alteración de las organelas. Estos daños son debidos a la presencia de la capsula glicoproteica que rodea al embrión a partir de la etapa de blastocisto, impidiendo la adecuada difusión del CP a las células de la masa interna. Además, el desarrollo del blastocele, condiciona el proceso de deshidratación, aumentando las probabilidades de formación de cristales intracelulares durante la congelación que dañen las células embrionarias.

Por su parte Martínez y col. (2014) también dice que se obtienen mejores resultados cuando se utilizan embriones cuyo diámetro es menor de 300  $\mu\text{m}$  que

cuando se utilizan embriones cuyo diámetro es mayor de 300  $\mu\text{m}$  (tasa de preñez < 20 %).

### **3.5. Ventajas de la criopreservación de embriones**

De la Fuente (2009) menciona algunas ventajas de la congelación de embriones, incrementa la difusión de genes (incremento de la producción, implantación rápida de cambios en la producción), limita la transmisión de enfermedades, son de cobertura mundial ilimitada.

El uso de embriones criopreservados permite (Melendres, 2012).

- Utilizar eficientemente donante y receptoras
- Incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie
- Transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia
- Controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas
- Conservar razas en vías de extinción
- Crear bancos de germoplasma de valor pecuario

Por su lado Teodoro (2011) menciona algunas ventajas de embriones congelados sobre embriones frescos.

#### **Ventajas operativas:**

- La congelación del sobrante de embriones sobre las receptoras disponibles, aprovechando todo el material genético.
- Transferencia simultánea de embriones de diferentes combinaciones de padres. Esto es importante para las exposiciones y para las pruebas de comportamiento.

- Los nacimientos pueden programarse de acuerdo al manejo de la explotación.
- Los embriones congelados esperan en nitrógeno líquido la sincronización de los celos de las receptoras y el momento óptimo para la transferencia

#### **Ventajas comerciales:**

- Los embriones congelados, procesados de acuerdo a las normas sanitarias sugeridas por la IETS, no transmiten enfermedades, por lo tanto desaparecen las barreras sanitarias haciendo posible el comercio internacional de embriones.
- Los embriones pueden ser descongelados y transferidos en cualquier época del año y región, en receptoras adaptadas a los factores climáticos del lugar.

### **3.6. Resultados de fertilidad con embriones frescos vs congelados**

Según Colazo y Mapletoft (2007) mencionan que en Canadá, más del 70 % de las transferencias de embriones se realizan en el ganado lechero y aproximadamente el 70% de los embriones son congelados anualmente, de los cuales 22.000 han sido exportados en el 2006 (Asociación Canadiense de Transferencia de Embriones).

En un estudio realizado por Ariza y col. (2006) haciendo evaluaciones retrospectivas de la tasa de preñez, menciona que observaron que cuando se transfieren embriones en fresco se obtienen mayores porcentajes de preñez que cuando los embriones son criopreservados, esto debido a que la viabilidad de los embriones congelados baja por daños en las blastómeras debido al mismo manejo de temperaturas en la congelación. Por otro lado en cuanto a los embriones

criopreservados se observa un mayor porcentaje de preñez en los congelados en glicerol, tal vez debido a la poca toxicidad y poco daño celular al descongelar. De otra manera al evaluar los que fueron criopreservados con etilenglicol hubo una disminución del porcentaje de preñez, como se observa en la tabla siguiente.

**Cuadro 2: Tasa de preñez de acuerdo al tratamiento recibido por el embrión antes de la T.E, Ariza y col. (2006).**

Tratamiento	Tasa de preñez
Etilenglicol	14.24 %
Glicerol	21.62 %
Fresco	43.67 %

En otro trabajo realizado por Garrote y Scardaccione (2010) mencionan que no encontraron diferencias significativas en el número de receptoras preñadas con embriones frescos vs congelados. De acuerdo a las tasas de gestación observadas en la tabla el porcentaje de preñez con embriones frescos independientemente de la droga usas en este estudio fue 58%, con embriones congelados obtuvieron el 56%.

**Cuadro 3: Tasa de preñez de embriones frescos vs congelados, Garrote y Scardaccione (2010).**

		Receptoras transferidas	Preñadas	% de Preñez
Grupo control	TEC	254	143	56.30
	TEF	300	175	58.33
Grupo Meloxicam	TEC	235	132	56.17
	TEF	290	169	58.28
Total		1.079	619	57.37

Por su parte Rodriguez y col. (2007) demuestran en un trabajo realizado con 174 receptoras, de las cuales (n=51) fueron transferidas con embriones frescos, (n=46) con embriones calidad 2 (n= 5) y con embriones de calidad 3; las receptoras restantes (n=123) transferidas con embriones congelados de calidad 1. De la misma forma se transfirieron embriones en estadio 4 (n=44) y estadio 5 (n=6) en fresco y, en estadio 4 (n=42), estadio 5 (n=38), estadio 6 (n=27) y estadio 7 (n=16) congelados. El resultado de dicho trabajo refleja la tasa de preñez total, teniendo en cuenta tanto frescos como congelados, fue de 42% (73 de 174). En este experimento obtuvo una tasa de preñez con embriones frescos (31%, 16 de 51) fue menor que con embriones congelados (46%, 57 de 123).

### **3.7. Resultados de investigaciones actuales en el estado de Coahuila**

En un estudio realizado por Martínez (2009), utilizando semen sexado y no sexado, los embriones en fresco demuestran que la tasa de gestación en receptoras de acuerdo al embrión recibido presentó una tendencia estadística a ser diferentes, siendo mayor para los embriones producidos con semen sexado, como se muestra en la tabla siguiente, adaptada de dicha investigación.

**Cuadro 4: Tasa de gestación de las hembras receptoras de acuerdo al tipo de embrión recibido (sexado y no sexado), Martínez (2009).**

Tipo de Embrión	Receptoras	Total preñadas	%
No sexado	11	3	27.27a
Sexado	4	3	75.00b

Literales diferentes P= 0.09

De acuerdo a las tasas de gestación observadas en la tabla el porcentaje de preñez con embriones frescos independientemente del semen utilizado fue de un 40% (6/15) de acuerdo a la literatura revisada, (Rommel, 1996 citado por Martínez, 2009) menciona que actualmente la tasa de preñez con embriones obtenidos in vivo puede variar de 40% a 70%.

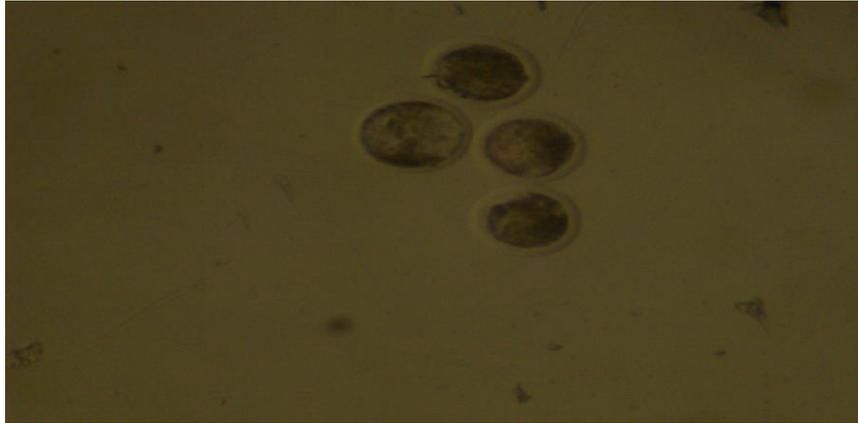
Por otro lado, Lagunes (2014) en un trabajo más reciente demuestra la utilización de embriones congelados midiendo la calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) al momento de la transferencia sobre la tasa de gestación de vaquillas Bradford. Donde se obtuvieron mejores resultados con un CL2 (cuerpo lúteo blando, de 1 a 2 cm de diámetro) obteniendo una tasa de concepción de 29 % y un 25% para CL3 (cuerpo lúteo de más de 2 cm de diámetro), como se muestra en el siguiente cuadro.

**Cuadro 5: Efecto de la calidad del C.L sobre la tasa de gestación de vaquillas Bradford que recibieron un embrión congelado, Lagunes, (2014).**

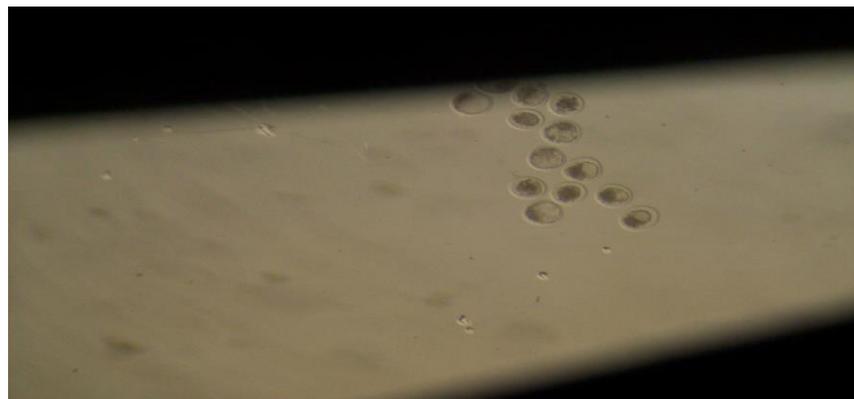
Calidad C.L.	Cantidad Embrionizadas	Cantidad Preñadas	% de gestación
CL 2	17	5	29 a
CL 3	28	7	25 a

Literales iguales no difieren estadísticamente

Si se compara los resultados de Martínez y Lagunes se puede observar una disminución de la fertilidad debido probablemente a la diferencia del tipo embrión utilizado (frescos y congelados), los resultados en este estudio fueron de un 26% (12/45) de preñez.



**Figura 7: Embriones bovinos de excelente calidad. (Fotografías tomadas de varios trabajos de comunicación personal, realizados en la Comarca Lagunera y Tamaulipas. Leyva, Morales y Di-Bella).**



**Figura 8: Blastocistos y mórulas vistos desde un Esteromicroscopio. (Fotografías tomadas de varios trabajos de comunicación personal, realizados en la Comarca Lagunera y Tamaulipas. Leyva, Morales y Di-Bella).**



**Figura 9: Embriones listos para la Criopreservacion. (Fotografías tomadas de varios trabajos de comunicación personal, realizados en la Comarca Lagunera y Tamaulipas. Leyva, Morales y Di-Bella).**

### **3.8. Avances sobre la criopreservación**

Seidel (2006) en un trabajo menciona que el método más común para hacer frente a las menores tasas de éxito de la criopreservacion de ciertos tipos celulares es modificar los procedimientos de criopreservacion, por ejemplo, variando concentración y combinación de crioprotectores, estudiando diferentes tiempos y temperaturas o utilizando aditivos, tales como azúcares o agentes tensioactivos. Un enfoque alternativo es modificando las propias células para hacerlas mas criopreservables.

También hay varios estudios que mencionan sobre el cambio de la criotolerancia de las células mediante la manipulación de la dieta del animal donante (Brinsko y col. 2005) o cultivar las células durante periodos variables (desde minutos hasta días) en los medios que cambiaran la congelabilidad de las células, este último es más atractivo ya que se puede controlar el proceso para mejorar el éxito de la criopreservacion. Otra área que vale la pena investigar es la estabilización de las membranas celulares con trealosa, un compuesto que las plantas utilizan de forma natural para aumentar la criotolerancia. Una de las cuestiones es como transferir

este compuesto en el citoplasma de la célula (Seidel, 2006) que es ahí donde funciona normalmente este compuesto.

### **3.9. Vitrificación**

Desde el punto de vista de la física, la definición de vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin formación de cristales de hielo. Podría considerarse como un aumento extremo de la viscosidad (Vajta, 2000).

Por otra parte el nombre de este proceso de congelamiento hace referencia a la apariencia macroscópica que toma dicha solución, permaneciendo clara y transparente, en estado vítreo. Aunque este método evita en gran medida la formación de hielo intracelular y las lesiones derivadas, la vitrificación tiene otros efectos negativos que deben ser evaluados antes de optar por uno u otro sistema (Vajta y Kuwayama, 2006).

La vitrificación (Rall y Fahy, 1985) se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo.

Los protocolos de crioconservación convencionales como la crioconservación lenta o vitrificación implican daño celular debido a la formación de hielo intracelular, deshidratación o toxicidad por altas concentraciones de los crioprotectores (He y col. 2008).

Sin embargo para alcanzar el estado vítreo se requiere someter a la muestra a velocidades de enfriamiento muy elevadas y ha de ser expuesta a concentraciones de crioprotectores, muy superiores a las empleadas tradicionalmente en la congelación lenta. Por su parte los crioprotectores permiten que la solución adquiera una mayor viscosidad durante el enfriamiento, retrasando con ello la capacidad de reordenamiento de las moléculas del agua y disminuyendo su capacidad de formar cristales de hielo. Además, la tasa de enfriamiento rápida hace que disminuya bruscamente el movimiento molecular de

manera que estas moléculas no tengan tiempo de ordenarse y orientarse de acuerdo a sus cargas, por lo que se formará una masa amorfa (Kim y col. 2012).

De acuerdo a esto también Saragusty y Arav (2011) mencionan que este método busca generar una alta viscosidad y la rápida solidificación de las soluciones de vitrificación con el fin de disminuir la toxicidad del crioprotector, Campos-Chillón y col., (2009) a la vez que se reduce el tiempo de exposición en los medios de vitrificación, se busca evitar la formación de cristales de hielo en el espacio intracelular y extracelular del embrión.

Una de las características es que durante la vitrificación, la velocidad de enfriamiento es rápida ( $107^{\circ}\text{C}/\text{seg}$ ) y la concentración utilizada de crioprotectores es alta, pero en bajo volumen. Estas características hacen que los efectos tóxicos y las lesiones osmóticas, causadas por el crioprotector, disminuyan. Igualmente, al minimizar el volumen de la muestra, combinada con un enfriamiento acelerado, permite reducir la concentración de crioprotectores y la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelular (Ramírez y Bernal, 2012).

Sin embargo Maclellan y col. (2002) quienes realizaron estudios en equinos mencionan que la tasa de enfriamiento en este caso es de  $2000\text{-}2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para la vitrificación de oocitos equinos.

Otros autores también mencionan otras características tal es que en la vitrificación a medida que la velocidad de enfriamiento elegida aumenta, la concentración del crioprotector se puede bajar y viceversa (Vajta y Kuwayama, 2006).

### **3.9.1. Ventajas de la Vitrificación**

Ramírez y Bernal (2012) mencionan las principales ventajas de la Vitrificación.

- Contacto directo entre los embriones y el nitrógeno líquido.
- No hay cristalización del embrión.

- Utiliza altas concentraciones de crioprotector que disminuye el periodo de exposición del embrión a los crioprotectores.
- Los procesos de vitrificación - desvitrificación son rápidos.
- El uso de pequeños volúmenes provee un incremento significativo en la tasa de enfriamiento.
- Las tasas de enfriamiento, se pueden dar entre 15,000 y 30,000°C/ minuto.
- Se minimizan las crioinjurias por los cambios osmóticos.
- Se reduce el tiempo del procedimiento de criopreservación (entre 2-10 min).
- Los protocolos son sencillos.
- 10. Se eliminan los costos de adquisición de equipos.

Algunos autores describen el proceso de vitrificación de la siguiente manera:

- Por ejemplo Vajta y col. (2013) mencionan primeramente que es la exposición del material a criopreservar, ya sean ovocitos o embriones, a soluciones de vitrificación con concentraciones ascendentes de crioprotectores, que al mismo tiempo disuelto en un buffer en presencia o no crioprotectores no permeables.
- La siguiente etapa es el envasado del material a vitrificar en los dispositivos apropiados.
- Vanderzwalmen y col. 2012 menciona que el ultimo proceso es el descenso ultrarrápido de la temperatura. Este paso se realiza generalmente exponiendo la muestra directamente al nitrógeno líquido.

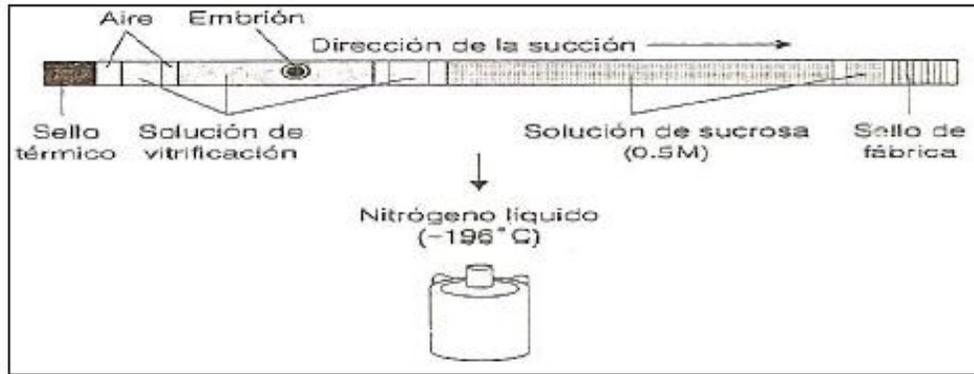
Por su parte Ramírez y Bernal (2012) mencionan que el proceso de vitrificación se requiere básicamente cuatro pasos:

- 1) Colocar al embrión en una solución de equilibrio (SE)
- 2) Poner en contacto al embrión con la solución vitrificante (SV)
- 3) Empacar y sumergir el embrión en nitrógeno líquido
- 4) Calentar el embrión vitrificado (desvitrificación).

Por su parte Belascoain y col. (2010) mencionan que la etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación en etilenglicol es la mórula compacta y blastocito temprano de embriones producidos *in vivo* o *in vitro*, así como también se ha demostrado que embriones producidos *in vitro* tienen menor tolerancia a la congelación debido a la formación de hielo intracelular, aumento en la concentración de lípidos y enzimas que digieren la zona pelúcida, lo que los hace más sensibles al enfriamiento y a la invasión de virus, bacterias y hongos.

### **3.9.2. Técnicas de vitrificación**

Antes de la vitrificación, los embriones deben ser equilibrados con el crioprotector a temperatura ambiente, la técnica propuesta por Dobrinsky y col. en 1991, indican que deshidrataron al embrión en SE (10% G y 25% PG) por 7 minutos a 20 °C, pasando a SV (25% G y 25% PG) manteniendo la misma temperatura hasta introducirlo al nitrógeno líquido.



**Figura 10: Pasos en la vitrificación de un embrión bovino.** La pajilla Francesa (0,25 ml) se carga por succión, primeramente la solución de sacarosa, enseguida se succiona aire, después la solución de vitrificación mas embrión, después se succiona aire-sellado térmico. Por último la pajuela se sumerge en nitrógeno líquido para vitrificación (Belascoain y col. 2010)

Varios trabajos se han publicado sobre los resultados de la tasa de preñez con embriones bovinos *in vitro*, se han usado diversos protocolos con el método de vitrificación. Estos protocolos difieren en el tipo y la concentración del crioprotector utilizado, en el número de pasos de equilibrio, en las técnicas de almacenamiento y en tiempos de exposición del embrión en cada una de las etapas del proceso, sin embargo aun no se ha propuesto un protocolo bien establecido que garantice la adecuada congelación de embriones donde no exista muerte celular, Martínez y col., (2002).

#### **IV.- CONCLUSIONES**

La criopreservación de ovocitos bovinos permite conservar fuentes genéticas para su posterior utilización en programas de mejoramiento genético. En la actualidad, la congelación convencional constituye la única metodología utilizable en programas de criopreservación de rutina, principalmente en aquellos que involucran la conservación de embriones producidos en *in vivo*.

Lo que corresponde a la vitrificación, ya que es la técnica más actual para criopreservar embriones, puede concluirse que los resultados de la viabilidad poscongelado son variables según el protocolo y la metodología de la obtención de los embriones.

Sin embargo existen avances en cuanto al estudio de métodos de criopreservación, tal es el caso de la congelación convencional, vitrificación, a pesar de ello quedan muchos aspectos por investigar y resolver, ya que es aquí donde se presentan los mayores problemas para obtener adecuados desarrollos embrionarios.

#### **V.- RECOMENDACIONES**

La relativa complejidad de los protocolos disponibles, la falta de un sistema de transferencia directa probado y la escasez de resultados que provengan de estudios de transferencia de embriones producidos *in vivo*, esto nos limita a la difusión de la vitrificación como un sistema confiable y rutinario de criopreservación de embriones.

Las recomendaciones son que sigamos trabajando con esta técnica para mejorarla, de la misma manera realizar estudios con embriones obtenidos *in vivo*, haciendo transferencia de embriones y así lograr resultados confiables y poder hacerla parte de trabajos cotidianos en cuanto a la criopreservación de embriones bovinos.

## VI.- LITERATURA CITADA

1. Ariza L. E., Camacho W. y Serrano N. C. A. 2006. Retrospective analysis of pregnancy rate after embryo transfer on F1 cows. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. VII, N° 04. Pág. 1-7.
2. Ávila P. L. M., Madero J. I., López C., León M. F., Acosta L., Gómez C., Delgado L.G., Gómez C., Lozano J. M. y Reguero M. T. 2006. Basic points in cryopreservation. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. Vol. 57, N° 4. Pág. 291-300.
3. Báez C.FJ. y Villamediana M.P.C. 2008. Criopreservación ovocitaria. Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito. Capítulo LX. Pág. 629-737.
4. Belascoain M. G., Díaz É.T., Hüter S. 2010. Técnicas para la Criopreservación de Embriones Bovinos. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela para Graduados. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. (IRAC). Pág. 1-19.
5. Boiso I. 2001. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. Vol. 18, N° 4. Pág. 1-3.
6. Brinsko S.P., Varner D.D., Love C.C. Blanchard T. L., Day B. C., Wilson M. E. 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. Theriogenology 63. Pág. 1519–1527.
7. Campos-Chillón L.F., Suh T.K., Barcelo-Fimbres M., Seidel G.E. y Carnevale E.M. 2009. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. Theriogenology 71. Pág. 349–354.

8. Celestinos M., y Gatica R. 2002. Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. Archivos de Medicina Veterinaria, Vol. XXXIV, N° 2. Pág. 157-165.
9. Colazo M. G. y Mapletoft R.J. 2007. Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. Ciencia Veterinaria. Vol. 9, N° 1. Pág. 20-37.
10. Cutini A., Teruel M. y Cabodevila J. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Revista Taurus N° 7. Pág. 28-39 y N° 8. Pág. 35-47.
11. De la Fuente J. 2009. Reproducción asistida en el vacuno de leche. Obtención y Evaluación. INIA- Reproducción Animal y Conservación Recursos Zoogenéticos. Pág. 1-11.
12. De la Fuente M.J.F. 2004. Transferencia de Embriones en Ganado Bovino. Disponible en: [http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros\\_online/libro\\_reproduccionbovina/cap24.PDF](http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/libro_reproduccionbovina/cap24.PDF). (Fecha de verificación: 30/11/2014). Pág. 375-388.
13. De Luca L. 2002. Método "one step" de crioconservación embrionaria. Sitio argentino de Producción Animal. Laboratorios Burnet S.A. Pág. 1.
14. Dobrinsky J. R., Hess F. F., Duby r. t. y Robl J. M. 1991. Cryopreservation of Bovine Embryos by Vitrification. Theriogenology. Vol. 35, N° 1.
15. Duica A. A., Tovío L. N., Grajales L. H. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. Revista de Medicina Veterinaria N° 14. Pág. 107-124.
16. Filipiak Y. y Larocca C. 2012. Biotecnología en reproducción bovina. Manual teórico-práctico. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Área de Biotecnología de la Reproducción Animal. Pág. 1- 43.

17. Fotografías tomadas de varios trabajos de comunicación personal, realizados en la Comarca Lagunera y Tamaulipas. Leyva, Morales y Di-Bella.
18. Garrote M. y Scardaccione L. 2010. Efectos de la aplicación de meloxicam al momento de la transferencia embrionaria sobre la tasa de preñez de receptoras bovinas. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba. Pág. 1-17.
19. Gil M.A.R. 2011. Efecto del método de criopreservación y de la blastoclectomía sobre el desarrollo in vitro de blastocistos bovinos. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina y Zootecnia. Pág. 1-41.
20. Giraldo J. J., Ordóñez R. S., Álvarez A. A. 2012. Vitrification as an alternative to conserve in vitro produced embryos. Journal of Agriculture and Animal Sciences. Vol. 1, N° 1. Pág. 1-14.
21. Grossmann M. y Santaló J. 1991. Aspect esteòrics de la congelació de gàmetes In embrions. Treb Soc Cat Biol. Vol. 42. Pág. 87-108.
22. Guerra R., Solis A., Sandoya G. y de Armas R. 2012. Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. Revista electrónica de Veterinaria. Vol. 13, N° 10. Pág. 1-16.
23. He X., Park E.Y.H., Fowler A., Yarmush M.L., Toner M. 2008. Vitrification by Ultra-fast Cooling at a Low Concentration of Cryoprotectants in a Quartz Microcapillary: A Study Using Murine Embryonic Stem Cells. Cryobiology. Vol. 56, N° 3. Pág. 223–232.
24. Hernández I. J. 2013. Evaluación y manipulación embrionaria en bovinos en estado fresco o criopreservados. Curso teórico - demostrativo en avances en la transferencia de embriones en bovinos. Pág. 44-59.

25. Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci. Vol. 62, N° 1-3. Pág. 3–22.
26. Izaguirre F.E. 2012. Adaptación de un método de vitrificación/calentamiento en fibroplug para la transferencia directa de blastocistos bovinos producidos in vitro. Tesis de maestría. Universidad de Oviedo. Pág. 1-40.
27. Kim Y.M., Uhm S.J., Gupta M.K., Yang J.S., Lim J.G., Das Z.C., Heo Y.T., Chung H.J., Kong I.-K., Kim N.H., Lee H.T., Ko D.H. 2012. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. Theriogenology 78. Pág. 1085–1093.
28. Kumar S., Millar JD y Watson PF. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. Cryobiology. Vol. 46. Pág. 246-253.
29. Lagunes E.M.A. 2014. Efecto de la Calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) y tiempo de Embrionización sobre la Tasa de Concepción en Receptoras Bradford con Embriones Angus en Transferencia Directa. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Pág. 1-42.
30. Landinez J., Baez F., Pirela A., Villamediana P. 2007. Effect of vitrification on the survival of in vitro matured bovine oocyte. Sitio Argentino de Producción Animal. APPA – ALPA. Cusco, Perú.
31. Maclellan L.J., Carnevale E.M., Coutinho M.A., Scoggin C.F., Bruemmer J.E. y Squires E.L. 2002. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. Theriogenology 58. Pág. 911-919.
32. Martín I. y Monge A. 2012. Congelación de embriones equinos: factores a tener en cuenta y desarrollo de la técnica. I Congreso Solidario de Clínica Equina. Pág. 114- 121.

33. Martínez A. G., Valcárcel A., De las Heras M. A., De Matos D. G., Furnus C. y Brogliatti G. 2002. *Animal Reproduction Science* 73. Pág. 11–21.
34. Martínez A.G. 2006. Optimización de métodos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pág. 1-165
35. Martínez N. N., Pinzón J. E., Porras J. L., Pérez J. N., Buitrago E. R., Zambrano J. L., Jiménez C. 2014. Cryopreservation of Equine Embryos and First Report of a Native Colombian Breed Born by Transfer of an Equine Vitrified Embryo. *Rev. Med. Vet.* N° 27. Pág. 21-31.
36. Martínez T. F. A. 2009. Efecto comparativo del semen sexado y no sexado sobre la tasa de fertilización en vacas Holstein, en programas de transferencia de embriones. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Pág. 1-35.
37. Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanism and implications. *The American Journal of Physiology*. Vol. 247. Pág. 125-142.
38. Medeiros C.M., Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57. Pág. 327-344.
39. Melendres M.J.E. 2012. Método de congelación de embriones bovinos en nitrógeno líquido. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Memoria técnica. Pág. 2-54.
40. Miyake T., Kasai M., Zhu S.E., Sakurai T., Machida T. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 40. N° 1. Pág. 121-134.

41. Mucci N., Aller J., Cabodevila j., Kaiser G., Hozbor F., Albeiro R.H. 2006. Criopreservacion de embriones bovinos. *Taurus*, Bs. As. Vol. 7, Nº 26. Pág. 20-35.
42. Palasz A.T. y Mapletoft R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotech. Adv.* Vol. 14, Nº 2. Pág. 127-149.
43. Rall W.F. y Fahy G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. Vol. 313. Pág. 573-575.
44. Ramírez O. y Bernal S. 2012. Vitrification of bovine embryos produced in vitro. *Rev. U.D.C.A Act. Y Div. Cient.* Vol.15. Pág. 419 – 429.
45. Rodriguez M.J., Giraldo E.C., Castañeda P.S., Ruiz C.T., Olivera A.M. 2007. Multifactorial analysis of pregnancy rates in embryos transfer programs in Colombia. *Rev.MVZ Córdoba* Vol. 12, Núm. 2. Pág. 978-984.
46. Saragusty J. y Arav A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. Pág. 141 1–19.
47. Seidel G.E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65. Pág. 228–235
48. Sommerfeld V. y Niemann H. 1999. Cryopreservation of bovine in-vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 38. Pág. 95-105.
49. Teodoro O. J. 2011. Criopreservacion de embriones bovinos. Universidad de Cuenca. Facultad de ciencias agropecuarias escuela de medicina veterinaria y zootecnia.
50. Trounson A. 1986. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril*. Vol. 4. Pág. 1-12.

51. Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*. Vol. 60–61. Pág. 357–364.
52. Vajta G. y Kuwayama M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65. Pág. 236–244.
53. Vajta G., Reichart A., Ubaldi F. y Rienzi L. 2013. From a backup technology to a strategy-outlining approach: the success story of cryopreservation. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* 8. Pág. 181–190.
54. Vanderzwalmen P., Zech N.H., Ectors F., Stecher A., Lejeune B., Vanderzwalmen S. y Wirleitner. 2012. Blastocyst transfer after aseptic vitrification of zygotes: an approach to overcome an impaired uterine environment. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol.25. Pág. 591– 599.
55. Vila L. 1984. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hemat.* Vol. 6. Pág. 227-236.
56. Vila L. y Carretero F. 1985. Manejo de congeladores programables. *BiolClinHematol.* Vol.7. Pág. 61-67.
57. Visintin J.A., Martins J.P.F., Bevilacqua E.M., Mello M.R., Nicacio A.C., Assumpcao M.A. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology* 57. Pág. 345-359.