



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA**

**“MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS EN NITRÓGENO  
LÍQUIDO”**

**MEMORIA TECNICA**

Previa la obtención del título de:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**AUTOR:**

**JOSÉ EUGENIO MELENDRES MÁRQUEZ.**

**TRIBUNAL:**

**DIRECTOR:** Ing. M.C. Guillermo Fernando Villa Samaniego

**ASESOR:** Ing. M.C. Rafael Vicente Oleas Galeas.

**Riobamba-Ecuador**

**2012**

Esta Memoria Técnica fue aprobada por el siguiente Tribunal

---

Dra. Georgina Ipatia Moreno Andrade.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL.**

---

Ing. M.C. Guillermo Fernando Villa Samaniego.  
**DIRECTOR.**

---

Ing. M.C. Vicente Rafael Oleas Galeas.  
**ASESOR.**

Riobamba, 26 de Abril del 2012.

## **AGRADECIMIENTO**

DESEO EXPRESAR MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A DIOS POR SER LA FUERZA QUE ME IMPULSA A SEGUIR ADELANTE POR MEDIO DE LA FE Y ESPERANZA

DE IGUAL MANERA A TODAS LAS PERSONAS COMO MIS PADRES Y HERMANAS E INSTITUCIONES COMO LA PJ, CEBYCAM-CES, MAGAP QUE DE UNA U OTRA MANERA HAN COLABORADO CON SUS IDEAS Y CONSEJOS Y QUE CREYERON EN MÍ Y ME ANIMARON EN ESTE ESFUERZO, POR SU INCONDICIONAL APOYO Y POR TODA LA AYUDA BRINDADA.

## CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstrac	vi
Lista de Gráficos	vii
Lista de Cuadros	viii
Lista de Anexos	ix
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	5
A. <u>CONDICIONES EN LA FECUNDACIÓN INVITRO Y SISTEMAS DE CONSERVACION DE EMBRIONES BOVINO</u>	5
1. <u>Fecundación in vitro</u>	5
2. <u>Obtención de los ovocitos y Embriones</u>	7
3. <u>Selección de Ovocitos</u>	7
4. <u>Cultivo Embrionario</u>	8
5. <u>Medios de Cultivo Embrionario</u>	9
6. <u>Suero sobre la cantidad y calidad de los embriones</u>	12
7. <u>Cultivo a 37 °C</u>	18
8. <u>Refrigeración 0-4 °C</u>	19
9. <u>Congelación a -196°C</u>	19
10. <u>Seeding</u>	21
B. <u>EMBRIOLOGÍA Y CRONOLOGIA EMBRIONARIA BOVINA</u>	25
1. <u>Embrión</u>	25
2. <u>El Embrión Bovino cultivado in vitro</u>	25
3. <u>Medio Ambiente</u>	25
4. <u>Cronología del Desarrollo Embrionario in vitro</u>	26
5. <u>Embriones Congelados y Vivos</u>	27
6. <u>Envasado de Embriones</u>	28
7. <u>Efectos del descenso térmico sobre los embriones</u>	28

C.	UTILIZACIÓN DEL NITROGENO LÍQUIDO PARA EL PROCESO DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS	32
1.	<u>Nitrógeno Líquido.</u>	32
2.	<u>Seguridad del Nitrógeno Líquido.</u>	32
D.	UTILIZACIÓN DE CRIOPROTECTORES PARA EL PROCESO DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS.	33
1.	<u>Concepto de Crioprotectores.</u>	33
2.	<u>Crioprotectores Utilizados en la Congelación de Embriones.</u>	34
E.	MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS TRADICIONALES LENTOS A MUY RÁPIDOS.	36
1.	<u>Congelación Tradicional Lenta.</u>	36
2.	<u>Congelación Tradicional Rápida con enfriamiento en dos etapas</u>	36
3.	<u>Congelación Tradicional Rápida con enfriamiento en una etapa.</u>	37
4.	<u>Congelación Tradicional muy Rápida.</u>	37
5.	<u>Congelación Convencional.</u>	38
F.	MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS NO TRADICIONALES ULTRARÁPIDOS.	40
1.	<u>Congelación a Dos Etapas.</u>	40
2.	<u>Congelación Directa.</u>	40
3.	<u>Congelación Ultrarrápida.</u>	41
2.	<u>Vitrificación.</u>	42
III.	<u>DISCUSIÓN.</u>	43
A.	DIFERENCIAS DE FECUNDACIÓN IN VITRO VS IN VIVO.	43
B.	SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES POR CRIOPROTECTORES.	44
1.	Porcentajes de Supervivencia de Embriones Bovinos entre dos Crioprotectores penetrantes.	44
C.	SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES POR MÉTODOS DE CONGELACIÓN.	46
1.	Porcentajes de supervivencia de embriones bovinos entre métodos tradicionales de congelación.	46
2.	Porcentajes de supervivencia de embriones bovinos entre métodos tradicionales y no tradicionales.	48

3. Porcentajes de sobrevivencia de embriones bovinos entre métodos no tradicionales.	49
4. Porcentajes de preñez de embriones bovinos entre métodos tradicionales, no tradicionales y vitrificación.	50
IV. <u>CONCLUSIONES</u>	51
V. <u>RECOMENDACIONES</u>	52
VI. <u>LITERATURA CITADA</u>	53
ANEXOS	

## RESUMEN

El objetivo de la presente memoria técnica fue describir y conocer los Métodos de Congelación de Embriones Bovinos en Nitrógeno Líquido llegando a varios acuerdos de investigación donde se pudo determinar que la congelación de embriones por Métodos Tradicionales, constituye la única metodología utilizable a gran escala en programas de criopreservación de embriones producidos in vivo. Con respecto a la vitrificación, existe una gran diversidad de protocolos y también una alta variabilidad en sus resultados. Que tampoco se miden al final de un proceso de gestación si no mas bien en la capacidad que tiene el embrión por conservar sus características hasta la revisión en laboratorio.

Estas técnicas han mostrado adaptarse de un modo muy promisorio teniendo en cuenta los resultados informados respecto a la a Métodos de Congelación Tradicionales y No Tradicionales. Sin embargo tienen procedimientos diferentes pero fines comunes: la deshidratación osmótica de la célula antes del almacenamiento en nitrógeno líquido y prevenir efectos deletéreos por cambios o por químicos tóxicos en la congelación intracelular, manteniéndose en perfectas condiciones durante varios años de conservación, además que en cada uno de los métodos de Congelación mas rápidos como los de Vitrificación y No Tradicionales se obtienen mejores resultados conservando una sobrevivencia Adecuada y una Taza de preñez Buena, respecto a los mas lentos que existe menor sobrevivencia Embrionaria.

## ABSTRACT

The research got to several agreements. It also determined that freezing by traditional methods is the only methodology that can be used in a large scale on embryo cryopreservation programs produced in vivo. About vitrification, there is a great diversity of protocols and also a high viability in its results which don't measure at the end of the gestation, but the capacity of the embryo to preserve its characteristics until checking in the lab.

These new techniques have showed they adapt to promissory way. They showed better results regarding to traditional and non-traditional methods. However, they have different procedures with common goals: cell's osmotic dehydration before storing in liquid nitrogen, and prevent deleterious for toxic chemicals in intercellular freezing. It maintains perfect conditions during several years: besides, on each quicker freezing methods as vitrification and non-traditional the research obtained better results preserving an adequate preservation and good pregnancy rate regarding to the slowest where there's a lower embryo survival.



**LISTA DE GRAFICOS**

No.		Pág.
1.	SEEDING Y LA TEMPERATURA.	22
2.	TRASTORNOS SI SE REALIZA EL SEEDING A MAS DE 10 GRADOS BAJO 0.	23
3.	CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS SEGÚN LA VELOCIDAD.	24
4.	ESQUEMA DE UNA PAJUELA PLÁSTICA PARA CARGAR EMBRIONES.	28
5.	MÉTODOS DE CONGELACIÓN TRADICIONALES DE EMBRIONES BOVINOS LENTOS A MUY RÁPIDOS.	39
6.	MÉTODOS DE CONGELACIÓN NO TRADICIONALES DE EMBRIONES BOVINOS ULTRARAPIDOS.	41

**LISTA DE CUADROS**

No.		Pág.
1.	COMPARACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DESARROLLO IN VIVO E IN VITRO DE LOS EMBRIONES BOVINOS.	26
2.	CRONOLOGÍA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.	27
3.	DIFERENCIAS ENTRE EMBRIONES PRODUCIDOS IN VIVO vs IN VITRO.	44
4.	PORCENTAJES DE EMBRIONES GESTADOS BAJO DOS ALCOHOLES.	44
5.	PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO DOS ALCOHOLES.	45
6.	PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO DOS ALCOHOLES EN EL MÉTODO TRADICIONAL MUY RAPIDO.	46
7.	PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO TRES MÉTODOS TRADICIONALES.	47
8.	PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO UN MÉTODO TRADICIONAL CON DIFERENTE ORIGEN.	48
9.	PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO METODOS TRADICIONALES Y NO TRADICIONALES.	49
10.	PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO METODOS NO TRADICIONALES.	49
11.	PORCENTAJES DE PREÑEZ EN CADA UNO DE LOS METODOS DE CONGELACIÓN.	50

## **LISTA DE ANEXOS**

1. SOBREVIVENCIA DEL EMBRIÓN CON MÉTODOS TRADICIONALES.
2. SISTEMA DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS EN NITRÓGENO LÍQUIDO.
3. SEEDING.
4. VITRIFICACIÓN.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Las posibilidades de aplicación de la tecnología in vitro son múltiples y presentan un elevado interés en el caso del ganado bovino. La tecnología reproductiva in vitro se encuentra actualmente en un estado de desarrollo avanzado.

El actual grado de desarrollo de la tecnología reproductiva in vitro ha sido posible gracias a tres hechos fundamentales:

La definición de medios sintéticos cada vez más adaptados a los requerimientos específicos para que el embrión bovino vea satisfechas sus necesidades metabólicas durante las primeras fases de su desarrollo.

La congelación o criopreservación de embriones es un proceso complejo que consiste en enfriar los embriones hasta temperaturas muy bajas durante largos períodos de tiempo para respetar su integridad física y funcional.

Los embriones pueden ser congelados en distintos momentos de su desarrollo, pero no todos tienen la viabilidad suficiente para ser congelados. Normalmente se congelan sólo aquellos que presentan una buena morfología, ya que aquellos que son irregulares o presentan una fragmentación moderada o severa raramente superan el proceso posterior de descongelación.

Se suele realizar una congelación embrionaria con los embriones restantes no transferidos en una FIV. También cuando por circunstancias el animal puede no estar en una situación favorable para la implantación embrionaria o esté expuesta a un excesivo riesgo de salud.

La producción de embriones in vitro ofrece nuevas perspectivas para la aceleración del progreso genético y la utilización de bajas temperaturas para conservar esos embriones se la ha convertido en una herramienta indispensable para consolidar y aumentar el impacto de estas tecnologías. La criopreservación y almacenamiento de embriones a bajas temperaturas presenta ventajas tanto desde el punto de vista biológico como desde el comercial.

Por último, el desarrollo de un sistema que permite la obtención de ovocitos a partir de hembras vivas, conocido con el nombre de (OPU).

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

La utilización de las bajas temperaturas para conservar los embriones producidos por esta tecnología se ha convertido en una herramienta indispensable que permitirá consolidar y aumentar el impacto de estas tecnologías.

La criopreservación de los embriones supone el ralentizamiento de su metabolismo hasta un punto próximo a su detención, con el fin de sincronizar acontecimientos posteriores, o de modificar la ciclicidad reproductiva, y es una técnica ampliamente usada como complemento de los procesos de reproducción asistida.

Cuando realizamos un ciclo de fertilización in Vitro, FIV, nuestro objetivo es obtener varios embriones de "buena calidad" para transferir al útero de la futura madre. Para ello necesitamos obtener un número adecuado de ovocitos en función de las características de la donadora y la respuesta al tratamiento. Necesitamos un número "alto" de ovocitos porque no todos van a fertilizar y de los que fertilicen, no todos evolucionaran adecuadamente en el laboratorio durante los primeros días previos a la transferencia.

En general la media de embriones aptos para la transferencia se aproxima a un tercio del de los ovocitos obtenidos.

Sin embargo, el porcentaje de ovocitos que fertilizan y se desarrollan adecuadamente es muy variable y en ocasiones las tasas de fertilización son altas y la evolución de los embriones en el laboratorio es óptima.

En estos casos llegamos al día de la transferencia con varios embriones aptos para ser transferidos cuando solo podemos utilizar uno o dos para esa transferencia. El destino de los embriones no seleccionados para ser transferidos es la "criopreservación", es decir, la congelación para poder ser utilizados en el futuro conservando gran parte de su potencial para conseguir una nueva cria.

Según Monforte, C. (1998), la criopreservación y el almacenamiento de embriones a bajas temperaturas (Nitrógeno líquido-NL-), presenta numerosas ventajas, tanto desde el punto de vista biológico como desde el comercial:

Permite una reducción de costes derivados de la aplicación de las tecnologías reproductivas.

Facilita una disociación de todas estas técnicas de la actividad reproductiva cíclica que presentan las especies mamíferas de interés, consiguiéndose una independencia temporal del estado fisiológico de los animales (hembras receptoras, por ejemplo).

Limita la deriva genética.

Elimina las patologías que normalmente se asocian al mantenimiento de animales vivos.

Posibilita la conservación de razas o especies en riesgo de extinción mediante la creación de bancos de embriones congelados, manteniendo intacto el patrimonio genético.

La criopreservación está influida por un elevado número de variables, de forma que ninguna aproximación que contemple sólo uno o parte de los aspectos implicados garantiza una eficacia total.

A pesar de esto, y con independencia del sistema utilizado, los principios básicos persiguen una protección de las células frente a los principales efectos perjudiciales del proceso, a saber, formación de hielo intracelular, deshidratación y efectos tóxicos de los crioprotectores.

Por lo que en la siguiente Monografía o Memoria Técnica planteamos los siguientes objetivos:

1. Conocer los diferentes Métodos de Congelación de Embriones Bovinos, las ventajas, desventajas de ellos.
2. Identificar los procesos y parámetros técnicos o condiciones que se deben reunir en un proceso de congelación de embriones bovinos.

3. Comparar los resultados obtenidos en los procesos de congelación de embriones Bovinos en Nitrógeno Líquido de diferentes investigaciones.

#### **IV. REVISIÓN DE LITERATURA**

##### **A. CONDICIONES EN LA FECUNDACIÓN INVITRO Y SISTEMAS DE CONSERVACION DE EMBRIONES BOVINOS.**

###### **1. Fecundación in vitro.**

La fecundación "in vitro" (FIV o IVF por sus siglas en inglés), es una técnica por la cual la fecundación de los ovocitos por los espermatozoides se realiza fuera del cuerpo de la hembra bovina. La FIV es el principal forma mas rápida del mejoramiento genético como métodos de reproducción asistida . El proceso implica el control hormonal del proceso ovulatorio, extrayendo uno o varios ovocitos de los ovarios maternos, para permitir que sean fecundados por espermatozoides en un medio líquido. El ovocito fecundado (el preembrión) pueden entonces ser transferido al útero de una receptora, para iniciar un proceso de gestación.

El término in vitro es un término en latín que significa en cristal. Se utiliza porque en los primeros experimentos biológicos en los que se realizaban cultivos de tejidos fuera de los organismos vivos de los cuales procedían, se realizaban en contenedores de cristal, tales como tubos de ensayo, probetas o placas de Petri.

En la actualidad, el término in vitro se refiere a cualquier procedimiento biológico que se realiza fuera del organismo en el que tendría lugar normalmente, para distinguirlo de un experimento in vivo donde el tejido permanece dentro del organismo vivo en el que normalmente se encuentra. Coloquialmente, a cualquier cria obtenida a través de FIV, refiriéndose a contenedores de cristal o plástico denominados probetas, que se utilizan frecuentemente en los laboratorios de química y biología.

Sin embargo, normalmente la fecundación in vitro se realiza en placas planas denominadas placas de Petri; las placas de Petri utilizadas más a menudo están producidas en plástico, sin embargo, el nombre FIV sigue conservando.



Una vez que disponemos de ovocitos maduros, el siguiente objetivo es lograr la fecundación de los mismos, para ello se incuban junto con espermatozoides capacitados en un medio Tyrode, suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica.

En la especie bovina, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de heparina al medio. No obstante, para lograr unos resultados óptimos es necesario ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto (Seidel, L. 2004).

Según <http://www.reprobiotec.com>. (2004), los embriones bovinos son recolectados en una solución salina buffer fosfato (PBS Dulbecco), suplementada con 1% de suero o 0,1% de albúmina sérica (PBSS).

A medida que los embriones son localizados bajo la lupa estereoscópica, se los coloca en PBSS con un porcentaje mayor de suero (10 ó 20%) o albúmina 4%. Permanecen en este medio, a la temperatura del laboratorio 20-25°C hasta que se realiza la transferencia o se lleva a cabo otra manipulación.

La manipulación de los embriones in vitro se lleva a cabo siguiendo las disposiciones establecidas por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS), a fin de prevenir la transmisión de enfermedades (Manual de la Soc. Int. de Transferencia Embrionaria, cap. XVI).

Una evaluación morfológica detallada, a mayor aumento, considerando estadios de desarrollo y cualidades estructurales permite determinar que embriones están en condiciones de ser transferidos

Lindner, H. (1983), la transferencia en fresco debe ser realizada dentro de las 3-4 horas postrecolección, los embriones pueden ser conservados in vitro para su posterior transferencia mediante: Cultivo a 37°C, refrigeración entre 0°C y 4°C o congelación a -196°C.

## **2. Obtención de los ovocitos y Embriones.**

La obtención de los ovocitos se realiza a través de dos procedimientos básicos:

A partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm.

A partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU). Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de 6 meses de edad, durante los primeros 3 meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de 6 meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia.

Apartir de un proceso de Super Ovulación permitiendo que la vaca donadora pueda dar un mayor número de óvulos activos y luego de ello la IA respectiva, y luego a la extracción de embriones por proceso de lavado.

## **3. Selección de los ovocitos.**

La vaca es una especie mono-ovulatoria por lo que la mayor parte de los ovocitos obtenidos tras la aspiración folicular están destinados a degenerar. Ello hace necesario estimar la calidad de los ovocitos antes de utilizarlos para la maduración *In vitro*, ya que solamente una parte de los mismos tienen la capacidad de ser fecundados y soportar el desarrollo embrionario.

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea. El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar, Sato, J. (1990); Fair, L. (1995), de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110  $\mu\text{m}$  se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido aun la capacidad para madurar. Los ovocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiata.

#### **4. Cultivo Embrionario.**

Componentes de los medios de cultivo: parámetros biofísicos y elementos inorgánicos. Varios autores (Menezo, J. y Khatchadourian, H. 1991, Palasz, U. 1996) coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes:

##### **a. Osmolaridad.**

Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería  $280 \pm 20$  mosm/Kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mosm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario, Duque, W. (2003).

##### **b. PH.**

La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.

##### **c. CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.**

La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO<sub>2</sub> en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.

##### **d. El fluido oviductal bovino.**

Se caracteriza por bajos niveles de Na y altos niveles de K, comparados con los niveles plasmáticos.

Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos.

##### **e. El agua.**

Es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario. Las fuentes de agua utilizadas han sido el agua de

lluvia, la obtenida por sucesivas destilaciones. Boone, J. y Shapiro, C. (1990), o actualmente la producida por sistemas de purificación que utilizan el principio de ósmosis reversa.

En estos últimos equipos, el grado de pureza del agua puede ser controlado mediante la determinación de su resistencia al paso de la corriente eléctrica (cuanto mayor sea esta, mayor será su pureza). La mayor resistencia ofrecida es 18,3 megaohms-cm a 25°C.

#### **f. Elementos orgánicos.**

Actualmente, existe una gran cantidad de información, no siempre coincidente, referida al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares, sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, dos componentes son constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados corrientemente en la producción in vitro de embriones

### **5. Medios de Cultivo Embrionario.**

#### **a. Fuente de energía.**

Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de embriones son, en general, el lactato, el piruvato y la glucosa.

Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo, Reiger, F. (1992) y Thompson, L. (2000).

La falta de utilización de la glucosa durante los primeros estadios estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa, Gardner, J. (1998). Esta enzima acelera la glucólisis catalizando la formación de fructosa 1-6 bifosfato a partir de fructosa 6 fosfato, y se encuentra controlada alostéricamente por el cociente ATP-ADP, particularmente alto en este período Gardner, J. (1998). En esta etapa, la adición de glucosa a los medios de cultivos no solamente no sería

aprovechada, sino que, a su vez, generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario, Takahashi, F. (1992). Sin embargo, en embriones bovinos a partir del estadio de 8-16 células, Rieger, F. (1992) y en respuesta a una alta demanda de energía necesaria para la compactación, y la formación y expansión del blastocelo, Gardner, J. (1998), el cociente ATP-ADP podría disminuir, y con ello, la inhibición ejercida sobre la enzima mencionada, con lo cual aumentaría el consumo de glucosa. Este metabolito también participa en la síntesis de precursores de ácidos nucleicos y de lípidos, Gardner, J. (1998) y su disponibilidad sería importante durante la eclosión fuera de la zona pelúcida, Menezo, J. y Khatchadourian, H. (1991).

Con respecto a los lípidos, poco se sabe acerca de la importancia que tendrían en la producción de energía durante el desarrollo embrionario temprano, Thompson, J. (2000). Sin embargo, en los últimos años se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácido linoleico no como fuente energética, sino como fluidificador de las membranas plasmáticas.

## **b. Fuente de Proteína**

### **(1) Aminoácidos.**

Varios autores, Gardner, J. (1998), Lee, T. (2004), indicaron que los aminoácidos se encuentran dentro de los elementos más importantes como participantes de la regulación del desarrollo embrionario. Estos elementos serían utilizados como fuente de energía, como buffer intracelular, Edwards, C. (1998) y para la síntesis de proteínas, siendo incorporados por transportadores de membrana específicos regulados en función del estadio de desarrollo o en respuesta a señales externas.

Se ha demostrado que los aminoácidos no esenciales favorecerían el desarrollo en estadios tempranos, mientras que los esenciales harían lo mismo en embriones de más de ocho células, Gardner, J. (1998), Thompson, J. (2000), Van, W. (2001). Este cambio en la utilización de aminoácidos, pareciera deberse a requerimientos específicos de las células embrionarias, en donde las células

trofoblásticas, que dan origen a la placenta fetal, utilizarían aminoácidos no esenciales y glutamina, mientras que las de la masa celular interna, que originan al feto, tendrían preferencia tanto in vivo como in vitro, y su calidad, en términos de composición química por los esenciales Gardner, J. (1998).

## **(2) Macromoléculas.**

Usualmente se agrega suero bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA) como fuente de proteínas a los medios de cultivo embrionario, aunque los resultados obtenidos tanto en producción como en sobrevivencia poscriopreservación tras su inclusión son contradictorios y motivo de numerosos estudios. El suero constituye la fracción líquida resultante del proceso de coagulación sanguínea, depende usualmente del tipo y estado del donante (suero fetal bovino (SFB), suero de ternero recién nacido, suero de novillo o vaca, suero de vaca en celo (SVC), y de la partida o lote de formulación.

La albúmina es una proteína plasmática de carácter ácido, soluble en agua, con un peso molecular aproximado de 69.000, y constituye uno de los componentes más importantes del suero sanguíneo. Debido a la presencia de grupos reactivos en su molécula, puede unirse a diferentes sustancias (ácidos grasos, hormonas, etc.) y transportarlas en sangre hasta sus órganos blanco. Junto con la inmunoglobulina G, son las proteínas más abundantes del fluido oviductal.

Algunos de los efectos benéficos que justifican la utilización del suero y la albúmina son:

- Proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas (ej. metales pesados).
- Aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas.
- Reducir la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (placas de cultivo, pipetas, tubos, etc.).
- Tanto el suero como la BSA tienen un rol similar como suplemento proteico. Sin embargo, la posible presencia de elementos no identificados ligados a ambos determinan que algunos aspectos de su función no sean aún completamente comprendidos.

## **6. Suero sobre la cantidad y calidad de los embriones.**

Efecto de la suplementación con suero sobre la cantidad y calidad de los embriones producidos in vitro. En los últimos años, el suero ha sido objeto de numerosos estudios, tendientes a definir si su adición es definitivamente necesaria para mejorar los resultados de producción in vitro, en función de la cantidad y calidad de los embriones obtenidos.

Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando el desarrollo de mórulas y blastocistos. Al mismo tiempo, su empleo también se ha visto relacionado con una aceleración del desarrollo embrionario, Gómez, D. (2002), asociado a un número mayor de células embrionarias, y a una mejora en la tasa de producción y eclosión, Gómez, D. (2000), sin embargo, otros autores observaron que, tanto la tasa de producción, no fueron afectados por la presencia o ausencia de suero. Contrariamente, Lee, T. (1999) encontraron una disminución en esta última variable cuando adicionaron suero en los medios de cultivo.

El suero es considerado un compuesto variable e indefinido, Gardner, J. (1998), lo cual genera variaciones en la composición de los medios utilizados e interfiere con la repetibilidad de los resultados obtenidos. En este sentido se han observado diferencias en cuanto a la tasa de producción entre distintos ensayos publicados en los cuales se utilizó suero como suplemento proteico, y esto podría deberse a:

### **a. Utilización o no de cocultivo.**

Rorie, C. (1994). Observo que el suero producía un efecto positivo sobre la tasa de producción de embriones sólo si el cultivo se efectuaba en cocultivo con células somáticas. Teniendo en cuenta el impacto positivo del suero sobre el cultivo de células somáticas, Gardner, J. (1999), puede suponerse que el efecto benéfico de esta suplementación se ve potenciado a través de su acción sobre las células del cocultivo.

Tipo de suero y momento de su inclusión: el suero más utilizado es el SFB. Si bien es difícil concluir acerca de cuáles son los constituyentes del suero que presentan actividad embriotrófica, las diferencias mostradas entre dos tipos de suero, en términos de composición química, pueden determinar una fuente de variación capaz de tener un impacto significativo en la producción in vitro de embriones. Puede observarse que la concentración de glucosa es 6 veces superior en el suero fetal respecto al del bovino adulto. Teniendo en cuenta que la utilización de este elemento aumenta notablemente luego de los primeros 3-4 ciclos de división celular embrionaria, Gardner, J. (2000), Thompson, J. (2000), estas diferencias podrían contribuir a las variaciones observadas entre los ensayos. Con respecto a las proteínas, puede observarse también que sus concentraciones son superiores en un 85% en el caso del suero adulto respecto del fetal, y aunque poco se conoce acerca de la función de proteínas no específicas en el desarrollo embrionario, su metabolismo podría producir amoníaco, el cual, dependiendo de su concentración y del estadio embrionario que afecte, puede generar diferencias en cuanto a la producción total de embriones, Hammond, L. (2000), en ambos tipos de suero, la relación proteína/glucosa es distinta y notablemente superior para el caso del bovino adulto, aunque no se dispone de información acerca de su posible impacto sobre el desarrollo embrionario.

Variaciones en la concentración de factores embriotróficos: el factor transformante de crecimiento  $\alpha$  (TGF, transforming growth factor), y el factor de crecimiento similar a insulina reducen la incidencia de apoptosis y aumentan el número de células embrionarias Makarevich, M. (2002), mientras que el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  que induce apoptosis y fragmentación de ácidos nucleicos, Betts, K. (2001), la utilización de suero en los medios de cultivo podría introducir cantidades variables de estos factores con efectos positivos y negativos sobre el desarrollo embrionario y esto podría depender de la partida, tipo de donante y del procedimiento de preparación, entre otros.

Todos estos elementos podrían explicar la falta de consistencia en los resultados de los distintos autores que utilizaron suero, por lo que Byrne, C. (1999) concluyeron que el efecto embriotrófico del suero es complejo y que son



necesarios más experimentos para clarificar los componentes específicos que lo producen.

Algunos efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de cultivo son: alteraciones mitocondriales, Abe, L. (1999), Farin, C. (2001), excesiva producción de lactato, presencia de células oscuras y granuladas en la masa celular interna, aumento de células apoptóticas, Byrne, C. (1999), menor síntesis proteica y disminución de la relación células de la masa celular interna: células trofoblásticas, Fouladi, N. (2005) y del número de complejos de unión entre las células embrionarias.

Además, se observaron alteraciones durante la preñez en hembras gestantes de embriones producidos con suero, tales como alargamiento del período de gestación, Thompson, J. (1995) y nacimiento de crías con peso superior a lo normal.

Los embriones cultivados en presencia de suero presentan una morfología diferente comparados con los producidos sin suero, Gardner, J. (1999). Algunos autores observaron que, la suplementación con suero se encuentra asociada a un menor grado de compactación de las mórulas, Abe, L. (1999), y que tanto éstas como los blastocistos adquieren características similares a los obtenidos in vivo cuando son producidos en medios sin suero, Thompson, J. (1997).

Esto podría deberse a alteraciones a nivel de los complejos de unión intercelulares en respuesta a la suplementación con suero, Rodríguez, M. (1994). Boni, B. (1999) postularon que variaciones en la expresión de ARNm para la Connexina 43 (Cx43), una proteína que participa en la formación de las uniones de tipo gap en las células de los embriones en estadios de preimplantación, podría explicar algunas de las diferencias encontradas entre los embriones producidos in vitro y los obtenidos in vivo o, incluso, producidos en diferentes medios de cultivo incluyendo la presencia o ausencia de suero en los mismos.

Cada estadio embrionario se caracteriza por la activación de conjuntos específicos de genes. Es así como, Lazzari, H. (2002) y Rizos, W. (2003) demostraron que los embriones producidos in vitro en cultivos suplementados con suero presentaron alteraciones en la expresión de genes que desempeñan un rol

de particular importancia durante el desarrollo embrionario temprano. Una de estas fue precisamente la disminución de la transcripción del gen que codifica para Cx43, comparada con los embriones cultivados en un medio libre de suero.

**b. Efecto del suero sobre la viabilidad de los embriones criopreservados.**

Los embriones producidos in vitro presentan una alta sensibilidad a los procesos de criopreservación, Leibo, E. (1993), Pollard, O. (1994), siendo las diferencias morfológicas y/o metabólicas observadas respecto a los obtenidos in vivo las que parecerían ser las responsables. Leibo, E. (1993) determinaron que la densidad de los embriones producidos in vitro es menor que la de los obtenidos in vivo, y concluyeron que esto se debería a una mayor relación de lípidos: proteínas en el caso de los primeros.

La suplementación de los medios de cultivo con suero se ha relacionado con la acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas, Rodríguez, M. (1994), Thompson, J. (1995), Abe, L. (1999), la presencia de estas estructuras en los embriones bovinos producidos in vitro se ha asociado a su alta sensibilidad a los procesos de criopreservación en general, y en los desarrollados en medios de cultivo suplementados con suero en particular, Abe, L. (2002), basados en los experimentos de Nagashima, A. (1995), efectuados en embriones porcinos, distintos autores, reprodujeron la extracción de lípidos en embriones bovinos producidos in vitro mediante incubación con citocalasina (estabilizador del citoesqueleto por inhibición de la polimerización de filamentos de actina), centrifugación y remoción por microcirugía, observando un mayor porcentaje de sobrevida poscriopreservación en los embriones libres de gotas lipídicas.

Se ha demostrado que la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos comienza a disminuir a partir del estadio de mórula, coincidiendo con la aparición de mitocondrias maduras, Abe, L. (1999), pudiendo cumplir, de este modo, la función de reserva para momentos de gran demanda energética, como lo es la formación del blastocele. Por el contrario, en presencia de suero, la acumulación lipídica aumenta a partir del mencionado estadio, Lee, T. (1999), estos resultados plantean un interrogante acerca de cuál es el rol de las gotas lipídicas en el citoplasma de las células embrionarias, ya que su eliminación no resulta en una

disminución en la tasa de producción, sino que, además, mejora su calidad en términos de criorresistencia.

El origen de la acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en los embriones producidos *in vitro*, cultivados en medios suplementados con suero, actualmente es, desconocido, aunque existen dos teorías que podrían explicarlo:

La presencia de suero genera un efecto deletéreo sobre la estructura mitocondrial, lo cual, al producir alteraciones morfológicas y funcionales en esta organela provocaría una acumulación anormal de gotaslipídicas producto de alteraciones en su metabolismo, Dorland, O. (1994).

Teniendo en cuenta la capacidad de captación de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos por parte de las células somáticas en cultivo, podría inferirse que la acumulación de lípidos intracitoplásmicos por parte de los blastómeros se debería a la incorporación de lipoproteínas presentes en el suero adicionado a los medios de cultivo, Thompson, J. (1995), Abe, L. (1999).

Refuerzan la segunda hipótesis, al informar que el perfil de ácidos grasos contenidos en los embriones desarrollados en medios suplementados con suero fetal bovino es similar al que caracteriza al suero utilizado, diferenciándose, además, de los encontrados en los embriones producidos en medios de cultivo libres de suero. Estos autores concluyeron que la acumulación de ácidos grasos saturados de cadena larga e insaturados son de origen sérico.

Diversos autores Yamashita, A. (1999), Choc, C. (2001), Abe, L. (2002), obtuvieron mejores tasas de sobrevida poscriopreservación en embriones producidos en medios suplementados con BSA y libres de suero, independientemente del sistema de criopreservación empleado. De acuerdo con la criopreservación representa un desafío para los embriones producidos *in vitro*, capaz de detectar diferencias de calidad embrionaria que no son evidenciadas mediante otras evaluaciones.

Si bien no está totalmente claro cuál es el rol endocelular por el que actuarían la albúmina y el suero, algunas de sus propiedades físicas podrían ser reemplazadas mediante la utilización de sustancias definidas. El uso de polímeros sintéticos, como el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona, es frecuente desde

hace varios años en la producción *in vitro* de embriones, Gardner, J. (1998). Estos compuestos han demostrado proveer una buena actividad surfactante, similar a la albúmina, aunque se ha encontrado una menor tasa de producción de embriones y diferencias metabólicas importantes entre embriones cultivados con o sin estos componentes, Thompson, J. (2000), Lee, T. (2004), finalmente, se ha observado un menor porcentaje de gestación logrado con embriones producidos en medios suplementados con estos compuestos comparado con los obtenidos con embriones cultivados con suero. Otro compuesto utilizado con el fin de reemplazar la albúmina o el suero ha sido el hialuronato, con el cual se han informado resultados muy alentadores en cuanto a tasa de producción y sobrevivencia poscriopreservación (Gardner, J. 1998).

Actualmente existen en el mercado compuestos formulados con el fin de reemplazar el suero en los medios de cultivo de distintas líneas de células somáticas. Entre estos se encuentran el Ultroser G<sup>®</sup> (Invitrogen), un sustituto del SFB, y CPSR-3<sup>®</sup> (Controlled Process Serum Replacement, SIGMA), el cual se obtiene por dializado del plasma bovino. Duque, D. (2003), demostraron que es posible producir embriones *in vitro* utilizando estos compuestos, y observaron que el reemplazo del suero por Ultroser<sup>®</sup> disminuyó significativamente la producción *in vitro* de embriones bovinos, mientras que utilizando CPSR-3<sup>®</sup> no obtuvieron diferencias en esta variable como tampoco en el número total de células embrionarias.

Finalmente, los conceptos presentados en esta revisión sugieren que el empleo de medios de cultivo libres de suero podría ser beneficioso para mejorar la calidad de los embriones producidos *in vitro*. Esto permitiría progresar en el entendimiento de los requerimientos embrionarios durante los estadios de preimplantación, ya que la eliminación de un compuesto altamente variable e indefinido, como lo es el suero, posibilitaría comprender la función que desempeña cada componente incluido en los medios de cultivo. Además, permitiría evitar las alteraciones embrionarias (morfológicas y fisiológicas) y durante la gestación, atribuidas a la utilización de suero en los medios de cultivo. Por último, una mejora en la calidad de los embriones producidos permitiría obtener mejores tasas de gestación, producidas principalmente por la transferencia de embriones criopreservados, posibilitando la aplicación comercial en gran escala de esta biotecnología.

## **7. Cultivo a 37°C.**

Los embriones bovinos pre-implantados generalmente son recolectados entre el sexto y octavo día de vida, empleando el método no quirúrgico. El cultivo es utilizado para evaluar el resultado de distintas manipulaciones (congelación, micromanipulación, etc.) que se efectúan con los embriones pero no como un paso previo a la transferencia.

Esto obedece a dos razones principales: En primer lugar, a que los embriones continúan desarrollando durante el cultivo, por lo tanto, esta técnica no puede ser utilizada para conservar un embrión hasta que una receptora asincrónica alcance el sincronismo óptimo, Wright, R. (1976). Por otra parte, se ha observado que los porcentajes de preñez disminuyen cuando se transfieren embriones que han sido cultivados Whittingham, T. (1975) y (1976), sostiene que la viabilidad embrionaria se ve seriamente disminuida cuando la extensión del cultivo es mayor de 24 horas.

El cultivo de embriones se realiza en medios cuyo pH oscila entre el 7,2 y 7,6 y cuya osmolaridad varía entre 270 y 310 mosm.

El PBSS modificado por Whittingham, T. (1971) es el medio utilizado comúnmente cuando el cultivo no se extiende por más de 24 horas. Los medios conteniendo bicarbonato, son más apropiados para el cultivo de embriones pero requieren una atmósfera controlada, con presencia de CO<sub>2</sub> para mantener el pH fisiológico. Estos medios son utilizados en cultivos cuya duración es mayor de 24 horas, Rajamahendran, A. (1985).

Al medio de cultivo, al igual que al de recolección, se le incorpora una fuente de proteínas. Esta se efectúa con la suplementación del medio de cultivo con 10% de suero ó 0,4% de albúmina.

La suplementación proteica tiene distintos fines, los más importantes son: Los principios de la criobiología estudiados por muchos han servido como base para el actual éxito y se aplican en la congelación de embriones mamíferos principalmente en bovinos aunque no del todo generalizables, ya que el embrión es una organización multicelular y su viabilidad depende tanto de la integridad celular como del estado de desarrollo.

Reducir la tensión superficial para favorecer la sedimentación de los embriones y evitar que estos se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación.

- Incorporar sustancias promotoras del crecimiento que favorecen el desarrollo embrionario.
- Absorber e inhibir metales pesados tóxicos que pueden estar presentes en el medio.

El medio de cultivo se esteriliza por medio de filtración a través de membranas de 0,22µm de diámetro de poro. Además, se le adicionan antibióticos, generalmente penicilina, estreptomycin y kanamicina.

La temperatura corporal de la especie embrionaria en cuestión es la ideal para el desarrollo de los embriones in vitro. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo dejan de ser ideales ocurre fácilmente cuando se utilizan soluciones salinas balanceadas es conveniente que la temperatura del cultivo esté debajo de la corporal (no más de 4°C). De esta manera, los efectos tóxicos del medio son menos pronunciados y también es menor la evaporación.

## **8. Refrigeración 0-4 °C.**

Según <http://www.reprobiotec.com>. (2004), la refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBSS envasados en pajuelas de 0,25 ml y colocadas en un refrigerador (común o portátil). Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura, de manera similar a como se realiza la estabilización durante la congelación de semen.

## **9. Congelación a -196°C.**

Es la técnica de elección para conservar embriones in vitro. Se considera que los embriones pueden ser mantenidos a -196°C durante doscientos años o más, sin afectar sus viabilidad y sin causarles cambios genéticos. Este hecho, convierte a la congelación de embriones en una herramienta insustituible para el comercio internacional de reproductores.

Según <http://www.produccionbovina.com>. (2002), la sobrevivencia del embrión a la congelación depende entre otros factores del tamaño de sus células, relación volumen superficie, permeabilidad al agua y el coeficiente de temperatura de dicha permeabilidad.

Por eso, en una misma especie, características propias de un tipo celular o estado de desarrollo embrionario no puedan ser totalmente extrapoladas a otro tipo celular o estado de desarrollo embrionario; tampoco se pueden extrapolar totalmente características propias de un mismo tipo celular o estado de desarrollo embrionario pero de diferentes especies.

Los factores que producen lesión celular dependen de la temperatura, tiempo, velocidad del cambio de temperatura y el estado físico del agua.

El efecto solución y los cristales de hielo intracelular son los factores básicos implicados en el daño celular y a pesar que fueron descritos hace más de 30 años se siguen considerando para obtener altas tasas de sobrevivencia luego del descongelamiento.

El empleo de los embriones congelados, entre otras cosas, posibilita:

- 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.

Leibo, E. (1989), resume la congelación de embriones en cuatro etapas fundamentales comunes a los distintos métodos utilizados. Ellas son:

- Exposición de los embriones a agentes crioprotectores.
- Enfriamiento desde temperaturas fisiológicas hasta temperaturas lo suficientemente bajas como para causar un virtual cese de todas las

reacciones químicas inducidas térmicamente.

- Calentamiento desde la temperatura de conservación (-196 °C) a temperaturas fisiológicas.

Si bien el resultado de la congelación depende fundamentalmente de la forma en que se llevan a cabo estos procedimientos, está condicionado previamente por dos factores.

Ellos son: la calidad del embrión y el tiempo que transcurre desde la recolección hasta que comienza la congelación.

Cuando se congelan embriones de calidades muy buena y buena (grado I y II) se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular (grado III); Leibo, E. (1984).

Humblot, C. (1987). Por su parte, los porcentajes de preñez resultantes de la transferencia de embriones congelados son inversamente proporcionales al tiempo transcurrido desde la recolección hasta el comienzo de la congelación.

La viabilidad embrionaria disminuye significativamente cuando dicho período es mayor de 3 horas.

Los embriones pueden ser conservados a -196°C utilizando el método de congelación standard, la vitrificación o el método de congelación rápida.

La principal diferencia que tiene el método de congelación standard con respecto a los otros es que en él, el descenso de temperatura se efectúa de manera controlada utilizando equipos programables.

## 10. **Seeding**

Es la inducción a una cristalización en el medio extracelular a unos 2° a 4°C por debajo del punto de congelación del medio, para permitir un resguardo de integridad del embrión en el momento de congelación para no sufrir degeneración embrionario y con ello disminuir la viabilidad, gráfico 1.



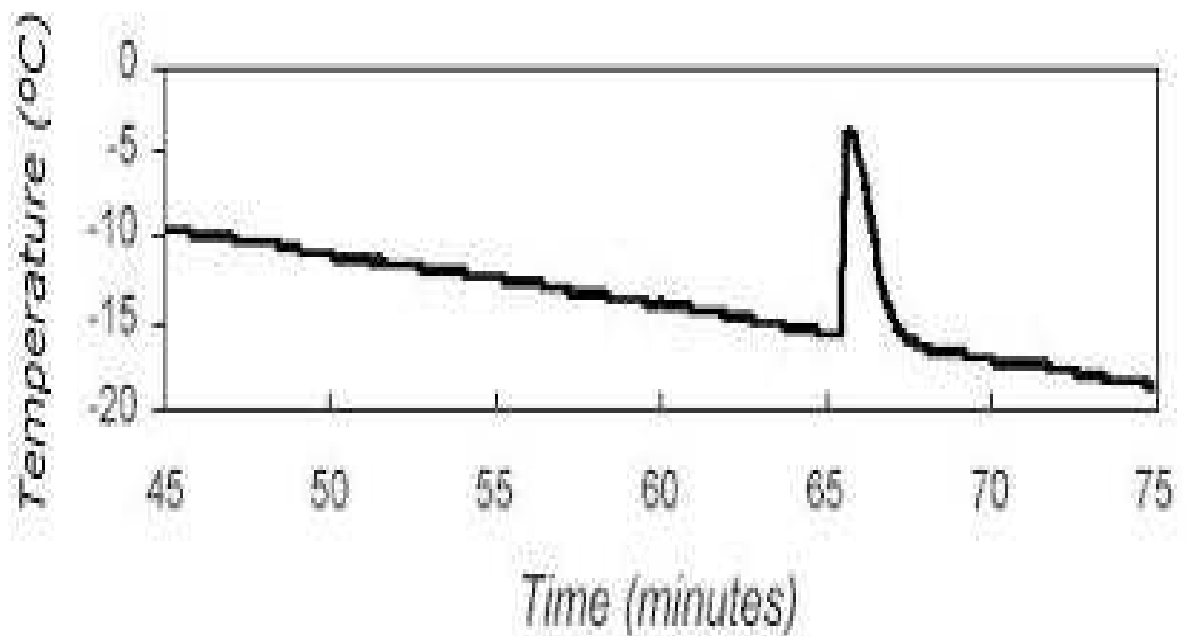
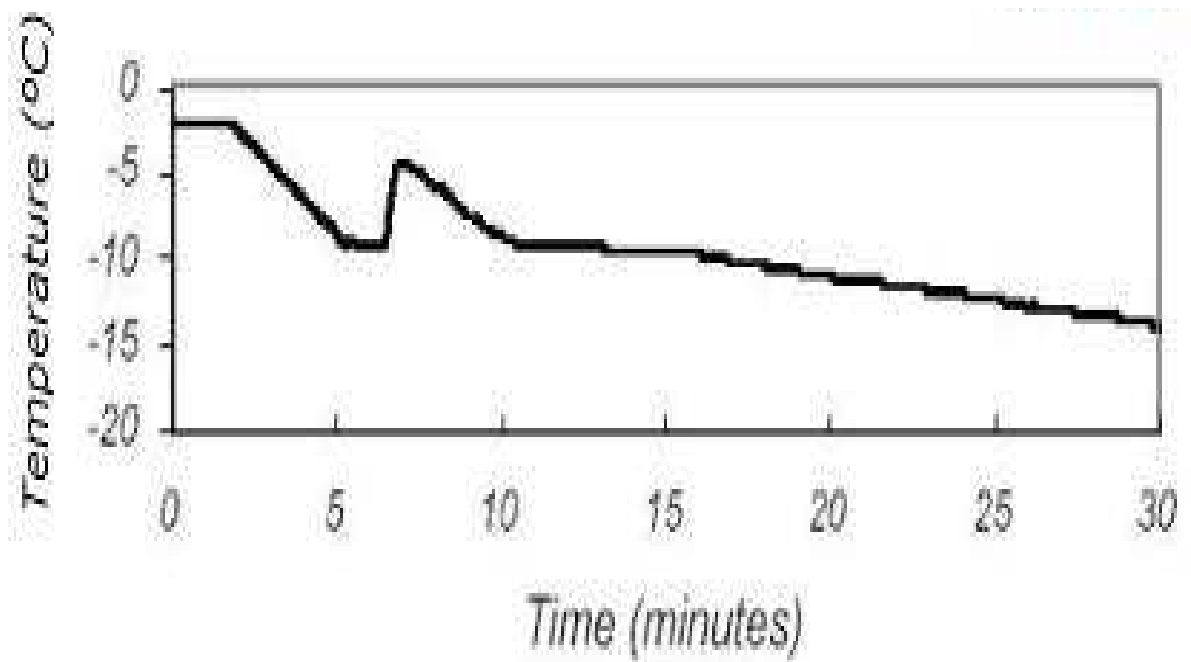


Gráfico 1. Si se realiza el seeding el aumento de temperatura subsiguiente es pequeño. Abajo: Si no se realiza el seeding las pajuelas llegan a mucho menor temperatura antes de la nucleación con el subsiguiente gran aumento de la temperatura.

Esto se efectúa luego de 5-7 minutos de introducidas las pajuelas en la criocámara, tocando el extremo de las pajuelas con un elemento metálico enfriado en N2 líquido. Con este procedimiento se evita un sobreenfriamiento excesivo de la solución y por lo tanto, se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación de calor latente de cambio de estado.

El potencial químico del agua intracelular es mayor que el del agua y hielo extracelulares, entonces el agua tiende a fluir fuera de la célula y se congela externamente. Al congelar el agua extracelular los solutos se concentran y fluye agua de la célula para equilibrar el medio, gráfico 2.

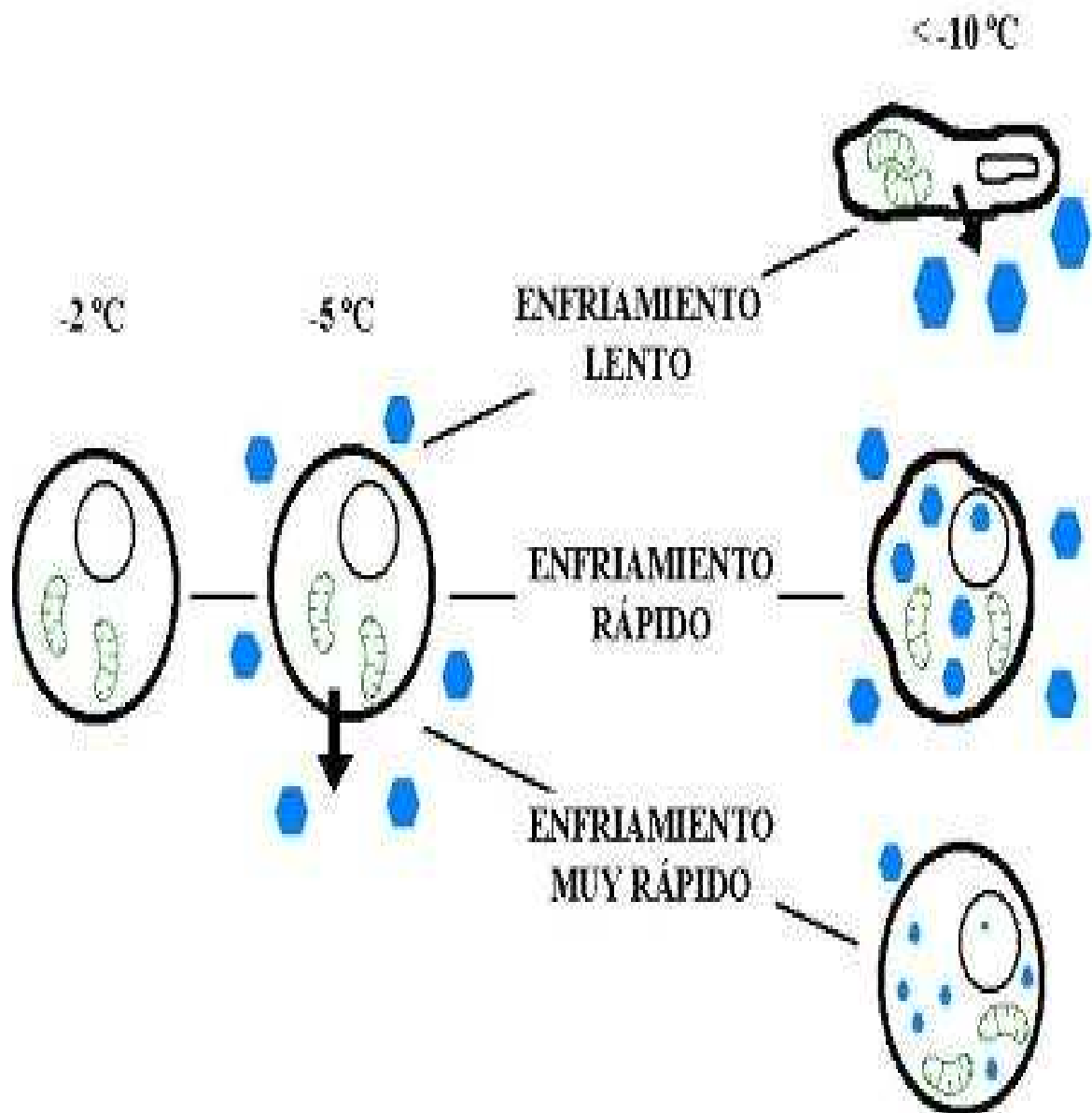


Gráfico 2: Trastornos si se realiza el seeding a mas de 10 grados bajo 0.

Según <http://www.produccionbovina.com>. (2002), luego que se realiza el seeding los embriones deben permanecer a temperatura constante durante unos minutos para lograr equilibrio en la osmolaridad y temperatura intracelular caso contrario sufrirá otros efectos degenerativos el embrión, ya que si es muy lenta producirá Deshidratación Osmótica y si es Muy Rápida una Cristalización en el Medio Intracelular, gráfico 3.

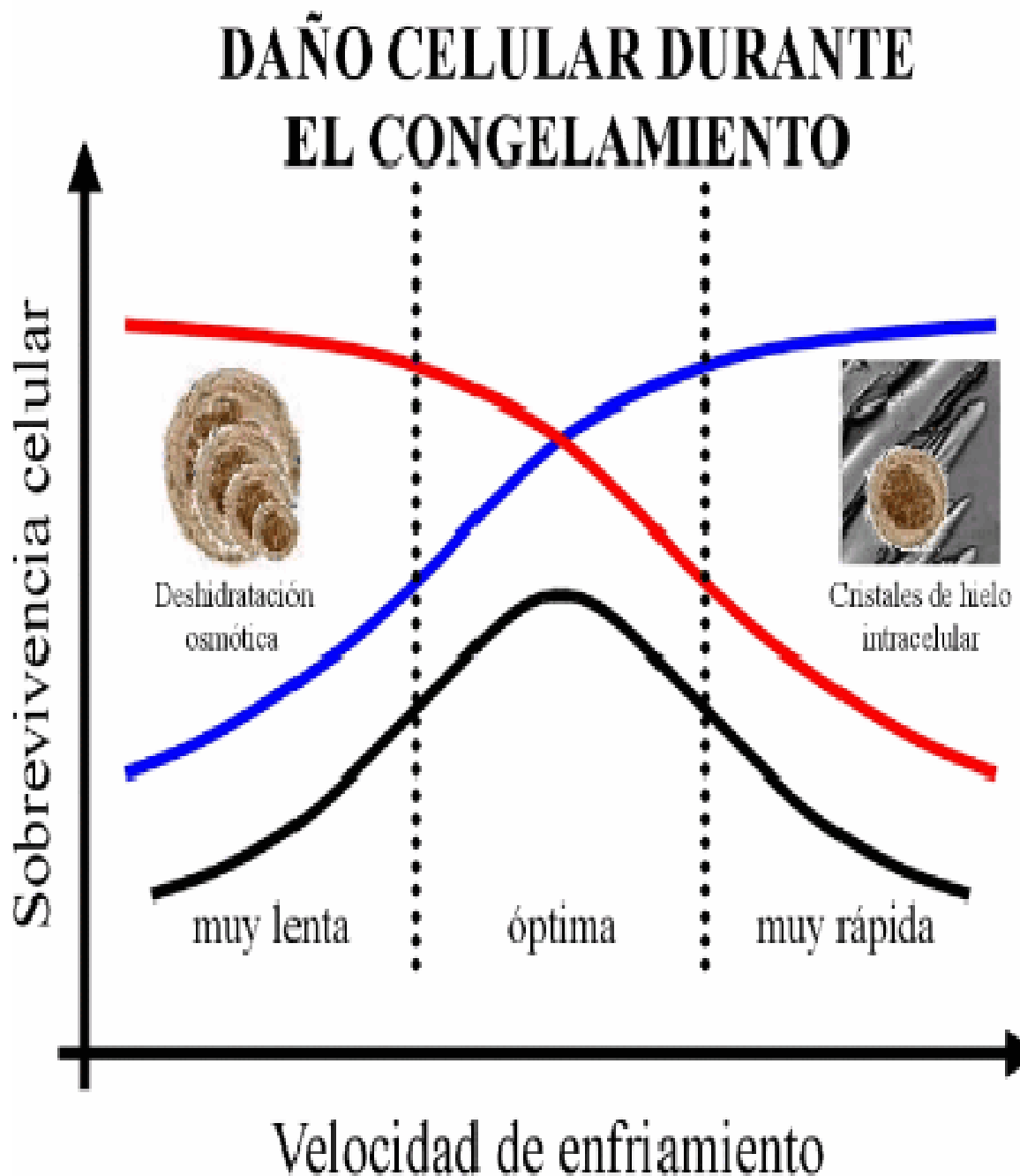


Gráfico 3: Curvas de sobrevivencia de células según la velocidad de congelación, para las causas de lesión celular al congelamiento.

## **B. EMBRIOLOGÍA Y CRONOLOGIA EMBRIONARIA BOVINA**

### **1. Embrión.**

Según <http://www.ria.asturias.es>. (2002), el embrión de un animal es la etapa inicial de desarrollo de éste mientras se encuentra en el huevo o en el útero de su madre. En el bovino, el término se aplica hasta el final de la octava semana desde la concepción (fecundación). A partir de la octava semana, el embrión pasa denominarse feto.

En los organismos que se reproducen de forma sexual, la fusión de los espermatozoides y el óvulo en el proceso denominado fecundación, determina la formación de un cigoto, que contiene una combinación del ADN de ambos progenitores.

### **2. El Embrión bovino cultivado in vitro.**

Según Bavera, J. (2004), desde el inicio de la aplicación de la tecnología in vitro, se han desarrollado numerosos sistemas de cultivo capaces de llevar a buen término la producción de embriones bovinos. Estos sistemas se clasifican en función de su composición, o de la presencia o no de células en el medio de cultivo, como soporte del desarrollo embrionario.

Las formulaciones de estos medios derivan de estudios realizados sobre la composición bioquímica de los medios tubárico y uterino, así como del análisis de las necesidades metabólicas del embrión.

### **3. Medio Ambiente.**

Según Monforte, C. (1998), el medio ambiente en el que se desarrolla el embrión in vitro difiere sustancialmente del que existe en condiciones in vivo. Durante su desarrollo in vitro los embriones se ven expuestos a choques térmicos, fuentes luminosas, atmósfera gaseosa y a unas condiciones de cultivo estáticas

caracterizadas por una importante cantidad de medio rodeando al embrión que puede aportar un exceso, o bien carecer de los nutrientes necesarios, cuadro 1.

Cuadro1. COMPARACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DESARROLLO IN VIVO E IN VITRO DE LOS EMBRIONES BOVINOS.

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

Fuente: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.(2003).

#### **4. Cronología del Desarrollo Embrionario in vitro.**

El embrión se desarrolla y diferencia en el tiempo según una cronología bien caracterizada en la especie bovina.

Además considerar que en el proceso de congelación de embriones no llega a ningún estadio de mórula sino simplemente llega a existir nucleación del embrión fertilizado.

La fecundación marca el inicio del periodo embrionario caracterizado por una serie de divisiones celulares y la aparición de las primeras diferenciaciones, como lo indica el cuadro 2.

Cuadro 2. CRONOLOGÍA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.

HORAS	CRESIMIENTO
0-24 h	1 célula
24-42 h	2 células
42-54 h	4 células
54-72 h	5-8 células
72-102 h	8-16 células
102-120 h	16-32 células
120-144 h	Mórula
144-174 h	Mórula-Blastocisto
174-210 h	Blastocisto

Fuente: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.(2003).

### 5. Embriones Congelados y Vivos.

Los primeros experimentos asociados a la criopreservación de embriones de mamíferos se realizaron en el año 1971 por los doctores Whittingham, T. Leibo, E. quienes demostraron que embriones preimplantacionales de ratón se podían congelar a temperaturas lo suficientemente bajas como para permitir guardarlos por largos periodos.

De esta manera se pudo recuperar embriones vivos después de haber permanecido por un largo periodo congelado a  $-196^{\circ}\text{C}$  y a  $-269^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, desde un punto de vista práctico, como veremos más adelante, la temperatura del nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) es suficientemente baja como para permitir su almacenamiento por largo tiempo.

En la práctica de la criopreservación es conveniente recuperar de cada hembra el mayor número de embriones.

Esto se logra como una técnica relativamente sencilla destinada a inducir a las hembras a superovular, es decir que ellas ovulen un número de oocitos varias veces mayor al número que ellas normalmente producen, aumentando por lo

tanto el rendimiento. La fecundación in vivo o in vitro de estos oocitos llevará a la obtención de embriones de desarrollo y edad conocidos.

## 6. Envasado de los embriones.

Actualmente el elemento más utilizado para contener los embriones, tanto para la criopreservación como para su transporte y/o transferencia a una hembra receptora, lo constituye la pajuela de plástico de 0,25 ml de capacidad. Existen diversos modos de cargar las pajuelas, pero en la mayoría, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0,5 a 2 centímetros de solución de congelación separado de otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa separada por burbujas de aire. En general, las pajuelas un vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico, gráfico 4.

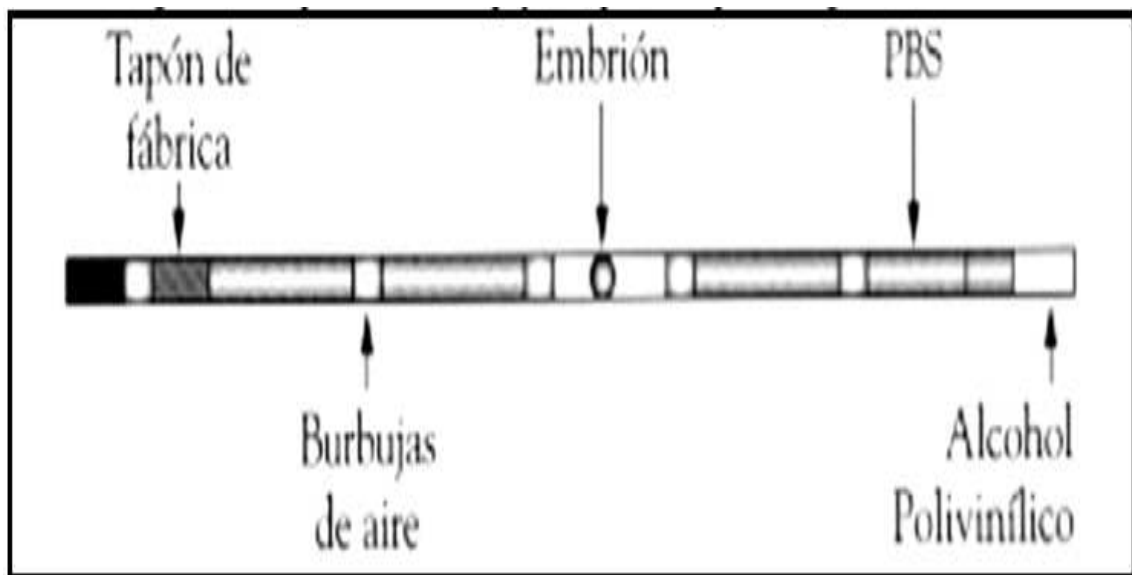


Gráfico 4. Esquema de una pajuela plástica para cargar embriones.

## 7. Efectos del descenso térmico sobre los embriones.

Según Mucci, N. Aller, J. Cabodevila, J. Kaiser, G. Hozbor, F. Alberio, R. Taurus, B. (2004), en la actualidad ningún protocolo de congelación o vitrificación disponible garantiza la total integridad de las estructuras así preservadas, no importa "cómo" los embriones sean criopreservados, "siempre alguno muere".

Durante la criopreservación, los embriones están expuestos a diversos tipos de injurias, las cuales son difíciles de considerar por separado ya que en muchos casos operan en conjunto. Las crioinjurias podrían deberse a:

**a. Formación de hielo intra o extracelular.**

Durante el proceso de criopreservación, la formación de hielo intracelular puede deberse a tasas de descenso térmico muy altas. Por ello el agua endocelular no tiene tiempo suficiente para alcanzar el medio extracelular, se sobreenfría, alcanza la temperatura de nucleación y finalmente se cristaliza dentro del citoplasma.

Por otra parte, si la tasa de ascenso térmico durante la descongelación o calentamiento no es lo suficientemente rápida, es posible que se produzca hielo intracelular como consecuencia de un nuevo pasaje a través de la temperatura de nucleación, o por crecimiento de los pequeños cristales que pudieran haberse generado durante el enfriamiento. Esto puede producirse además, por un desequilibrio entre la concentración del crioprotector y la tasa de descenso térmico.

**b. Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico.**

La adición o extracción de las sustancias crioprotectoras, así como el propio proceso de congelación (efecto de solución), producen cambios de volumen en las células embrionarias que, dependiendo de su magnitud, pueden afectar su sobrevivencia poscriopreservación.

La disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua puede determinar modificaciones en la composición del medio intracitoplásmico. En este caso, los solutos altamente concentrados podrían precipitar o afectar la conformación proteica y consecuentemente su función metabólica.



Por otro lado, la deshidratación favorecería la pérdida de ubicación normal de las estructuras citoplásmicas.

Según Mucci, N. Aller, J. Cabodevila, J. Kaiser, G. Hozbor, F. Alberio, R. Taurus, B. (2004), con respecto al aumento excesivo de volumen, pareciera ser crítico el manejo de los embriones inmediatamente después de la descongelación o el calentamiento.

La alta concentración de crioprotectores intracelulares puede determinar que las células embrionarias incorporen agua y aumenten excesivamente de volumen, pudiendo dañar estructuras internas o bien desintegrarse por completo.

### **c. Efecto tóxico del crioprotector.**

El citoesqueleto constituye una compleja red de filamentos proteicos, extendidos a través del citoplasma, que coordinan la organización y el movimiento intracitoplásmico.

Sin embargo, los elementos que lo constituyen presentan un comportamiento inestable, en donde las subunidades que lo componen se encuentran en constante recambio.

Aunque los crioprotectores son necesarios para minimizar los daños que puedan ocurrir durante la criopreservación, estos compuestos pueden también tener efectos nocivos sobre los embriones por toxicidad química.

Otras alteraciones asociadas con la adición de sustancias crioprotectoras son el aumento del espacio perivitelino, el aumento de tamaño mitocondrial y la presencia de vacuolas dentro de las mismas, así como la aparición de signos de degeneración nuclear.

**d. Alteraciones de las membranas celulares.**

Las membranas celulares (plasmática y de organelas) son adversamente afectadas por efecto osmótico durante los procesos de criopreservación y su lesión constituye uno de los indicadores más importantes de muerte celular. Cuando el contenido de agua intracelular disminuye por debajo de 10-20%, los componentes celulares permanecen muy juntos entre sí, pudiendo determinar que las membranas pasen de un estado gel de tipo laminar a uno hexagonal de fase II, aunque este proceso también puede producirse por efecto directo del frío.

**e. Fractura embrionaria o de la zona pelúcida.**

Este tipo de lesiones, probablemente se produzcan debido a diferencias en la expansión de los cristales de hielo, lo cual generaría cambios irregulares de volumen en los medios de criopreservación durante un rápido cambio de fase.

Durante la congelación convencional más del 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si las tasas de descenso ascenso térmico durante la congelación-descongelación no son adecuadamente ajustadas.

Según Mucci, N. Aller, J. Cabodevila, J. Kaiser, G. Hozbor, F. Alberio, R. Taurus, B., (2004), la utilización de elementos flexibles (pajuelas plásticas) para contener los embriones durante la criopreservación permite amortiguar los cambios de volumen de la solución.

Durante la vitrificación-calentamiento, al no producirse cambios de fase, la incidencia de este tipo de crioinjuria es menor. Esta lesión es más frecuente durante el calentamiento, y se produciría por el rápido pasaje a través de la temperatura en la cual se forma la fase vítrea (-110 a -135°C).

## **C. UTILIZACIÓN DEL NITROGENO LÍQUIDO PARA EL PROCESO DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS**

### **1. Nitrógeno Líquido.**

Según <http://www.reprobiotec.com>. (2004), el nitrógeno líquido es nitrógeno puro en estado líquido a una temperatura igual o menor a su temperatura de ebullición, que es de  $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una presión de una atmósfera. El nitrógeno líquido es incoloro e inodoro. Su densidad en el punto triple es de  $0,707\text{ g/ml}$ .

El nitrógeno líquido es una fuente de fácil transporte y compacta de gas nitrógeno sin presurización. Además, su capacidad para mantener temperaturas por muy debajo del punto de congelación del agua hace que sea muy útil en una amplia gama de aplicaciones, principalmente como un ciclo abierto de refrigerante. Debido a su gélida temperatura, tocarlo directamente podría causar con toda seguridad graves quemaduras por frío.

El nitrógeno líquido es el nitrógeno que es lo suficientemente frío como para existir en forma líquida. Se utiliza para la refrigeración y muchas aplicaciones criogénicas.

### **2. Seguridad del nitrógeno líquido.**

Según <http://www.reprobiotec.com>. (2004), el nitrógeno líquido es lo suficientemente frío como para causar quemaduras al contacto con tejidos vivos. Use equipo de seguridad al manipular nitrógeno líquido para evitar el contacto o la inhalación de vapores de frío extremo. Asegúrese de que las superficies expuestas de la piel están cubiertas y aislados preferentemente.

Debido a que se reduce tan rápidamente, la transición de fase de líquido a gas puede generar una gran presión muy rápidamente. No incluya el nitrógeno líquido en un recipiente sellado, ya que esto puede resultar en explosión o una explosión.

Añadiendo una gran cantidad de nitrógeno en el aire reduce la cantidad relativa de oxígeno. Esto puede resultar en un riesgo de asfixia. Gas nitrógeno frío es más

pesado que el aire, por lo que el riesgo es mayor cerca del suelo. El uso de nitrógeno líquido en un área bien ventilada.

Contenedores de nitrógeno líquido se puede acumular el oxígeno que se condensa en el aire. Cuando se evapora el nitrógeno, se corre el riesgo de oxidación violenta de la materia orgánica.

## **D. UTILIZACIÓN DE CRIOPROTECTORES PARA EL PROCESO DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS**

### **1. Concepto de crioprotectores.**

Un crioprotector es una sustancia que se utiliza para proteger los tejidos biológicos de la congelación de daños (daños causados por el hielo de formación). Ártico y la Antártida insectos, peces, anfibios y reptiles crean crioprotectores ( compuestos anticongelantes y proteínas anticongelantes ) en sus cuerpos para minimizar los daños de congelación durante períodos fríos del invierno.

Mayoría de los insectos a menudo utilizan los azúcares como crioprotectores. En el Ártico las ranas utilizan la glucosa , pero salamandras crean glicerol en sus hígados para su uso como crioprotector.

Crioprotectores operar simplemente aumentando la concentración de solutos en las células. Sin embargo, con el fin de ser biológicamente viable, deben penetran fácilmente en las células, y no es tóxico para la célula.

Crioprotectores convencionales son glicoles ( alcoholes que contienen al menos dos grupos hidroxilo ), tales como propilenglicol y glicerol, glicol de etileno se utiliza comúnmente como automóviles anticongelante y glicol de propileno se ha utilizado para reducir la formación de hielo en el helado, dimetilsulfóxido (DMSO) es también considerado como un crioprotector convencionales. Glicerol y DMSO se han utilizado durante décadas por criobiólogos para reducir la formación de

hielo en el esperma y los embriones que se conservan en frío de nitrógeno líquido .

Mezclas de crioprotectores tienen menos toxicidad y son más efectivos que un solo agente crioprotector. Una mezcla de formamida con DMSO, propilenglicol y un coloide fue durante muchos años el más efectivo de todos los crioprotectores creado artificialmente.

Mezclas de crioprotectores se han utilizado para la vitrificación , la solidificación es decir, sin ningún tipo de formación de cristales de hielo, la vitrificación tiene una aplicación importante en la preservación de embriones, biológicos y tejidos órganos para trasplante .

La vitrificación también se utiliza en la críonica en un esfuerzo por eliminar los daños de congelación.

Algunos crioprotectores función mediante la reducción de una solución o un material de la temperatura de transición vítrea . De esta manera, los crioprotectores evitar la congelación real, y la solución mantiene una cierta flexibilidad en una fase vítrea. Crioprotectores muchos de ellos también la función de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas biológicas, como las moléculas de agua se desplazan.

Enlaces de hidrógeno en soluciones acuosas es importante para la proteína y función del ADN. Por lo tanto, como el crioprotector sustituye a las moléculas de agua, el material biológico conserva su estructura original fisiológicos, a pesar de que ya no están inmersos en un medio acuoso.

Esta estrategia de preservación se observa más frecuentemente en anhidrobiosis.

## **2. Crioprotectores utilizados en la congelación de embriones.**

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesionan las estructuras citoplasmáticas, Mazur, A. (1984).

Esta deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación. En la congelación de embriones se utilizan 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.

**b. Impermeables o Extracelulares.**

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

Se ha demostrado lo importante que es el estado de desarrollo embrionario en la velocidad de penetración del crioprotector.

Leibo, E. (1977), demostró que la permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa luego de la fecundación, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa.

Esto se debería a la diferencia que existe en la relación área/volumen en un embrión en los primeros estadios del desarrollo.

## **E. MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS TRADICIONALES LENTOS A MUY RÁPIDOS**

En estas curvas de enfriamiento (o congelación) se han usado crioprotectores penetrantes a concentraciones de 1.5 - 2.0 molar (M), variando la velocidad de enfriamiento (de 0.1° a 0.6°C/min) y la temperatura de inmersión en N<sub>2</sub>L (de -30°C a -120°C).

### **1. Congelación tradicional lenta.**

Con esta curva se logró por primera vez sobrevivencia de embriones mamíferos. El enfriamiento es lento, de 0.1° - 0.3°C/min de temperatura ambiente a los -60° a -120°C y luego inmersión en N<sub>2</sub>L; la descongelación se ha hecho de 4° a 25°C/min.

El tiempo requerido para congelar los embriones es de unas 4.0 - 6.5 h. En embriones Bovinos la sobrevivencia varía de 33.0 % - 80.0 % *in vitro* y 25.7 % - 44.4 % de preñez (Willadsen, L. 1974; Merry, R. 1984), gráfico 5.

### **2. Congelación tradicional rápida con enfriamiento en dos etapas.**

Willaden, L. (1977), basado en trabajos con embriones ovinos y bovinos fue el primero en desarrollar una congelación rápida en embriones bovinos con enfriamiento lento en dos etapas, Willadsen, L. (1978). La velocidad de enfriamiento fue de 1°C/min de temperatura ambiente a -7°C; permaneciendo 10 minutos (a los cinco min *seeding*), luego a 0.3°C/min hasta -30°C, después a 0.1°C/min hasta -36°C luego inmersión en N<sub>2</sub>L.

Obtuvieron 76.2 % de sobrevivencia *in vitro*. Esta curva disminuye tanto el efecto solución como la formación de cristales de hielo intracelular, demostrando así que no es necesario llegar a los -60° o -80°C para sumergir los embriones en N<sub>2</sub>L. El

tiempo requerido para congelar los embriones disminuyó a unas 3 horas, gráfico 5.

En embriones bovinos la sobrevivencia ha variado entre 39.0 % - 93.0 % *in vitro*, 23.0 % - 64.0 % de preñez y 47.6 % - 85.0 % de nacimientos, Merry, R. (1984); Tervit, G. (1984); Martínez, C. (1993).

### **3. Congelación tradicional rápida con enfriamiento en una etapa.**

Lehn, J. (1981), publicaron una congelación en dos etapas (two-step). Hoy quedaría mejor definida como congelación rápida con enfriamiento en una etapa. La curva de enfriamiento fue: de temperatura ambiente a  $-6^{\circ}$   $-7^{\circ}\text{C}$  a  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , mantenimiento de la temperatura por 10 min, seeding, luego a  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $-30^{\circ}$ ,  $-35^{\circ}$  o  $-40^{\circ}\text{C}$  e inmersión en  $\text{N}_2\text{L}$ .

Cuando los embriones fueron sumergidos en  $\text{N}_2\text{L}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  hubo 63.0 % de sobrevivencia *in vitro* y 59.0 % de preñez. Con este método el tiempo requerido para congelar los embriones disminuyó aproximadamente a 2 horas, aumentando considerablemente el aspecto práctico de la congelación de embriones, gráfico 5.

En embriones bovinos la sobrevivencia varía entre 0.0 % y 80.0 % *in vitro* y 20.0 % a 73.0 % de preñez, Ware B. (1987); Schiewe, C. (1991); Shelton, H. (1992); McGinnis, C. (1993).

### **4. Congelación tradicional muy rápida.**

Los embriones son colocados directamente desde  $-4^{\circ}$  a  $-7^{\circ}\text{C}$  (o luego de un enfriamiento a más de  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), se mantiene la temperatura por 10 minutos (a los cinco minutos seeding) y luego se aplica un enfriamiento a  $0.3^{\circ}$  -  $0.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $-30^{\circ}$  a  $-35^{\circ}\text{C}$  y posterior inmersión en  $\text{N}_2\text{L}$ .

Así el tiempo requerido para congelar los embriones llegó a ser 1.5 horas; simplificándose aún más la congelación de embriones, gráfico 5.



En embriones Bovinos la sobrevivencia ha variado entre 23.3 % - 76.7 % in vitro, 44.4 % - 82.0 % de preñez y 0.0 % - 78.0 %.

### **5. Congelación convencional.**

La aplican hoy casi todos. Los embriones se colocan directamente a  $-7^{\circ}\text{C}$ , permanecen durante 10 minutos (a los cinco minutos seeding), y luego se hace un enfriamiento a  $0.5^{\circ}$  -  $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta los  $-35^{\circ}\text{C}$ ; de spués se sumergen en  $\text{N}_2\text{L}$ .

El avance logrado con esta curva reduce el tiempo de congelación a no mucho más de una hora, gráfico 5.

En Bovinos la sobrevivencia ha variado entre 53.3 % - 83.0 % in vitro, 22.7 % de preñez y 62.5 % de nacimientos (Songsasen, G. 1993 y 1995; Boggio, D. 1997 y 2001).

Esto ha significando un gran ahorro de tiempo y aumento en el aspecto práctico de la congelación de embriones, permitiendo que en muchos lugares se haga rutinariamente.

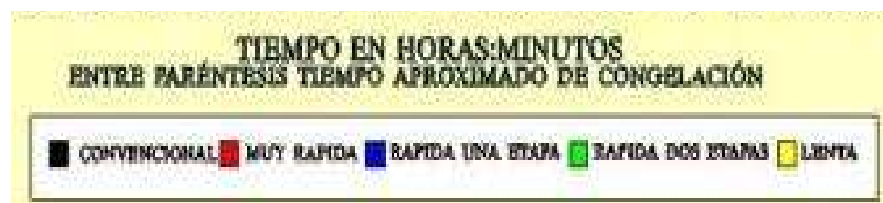
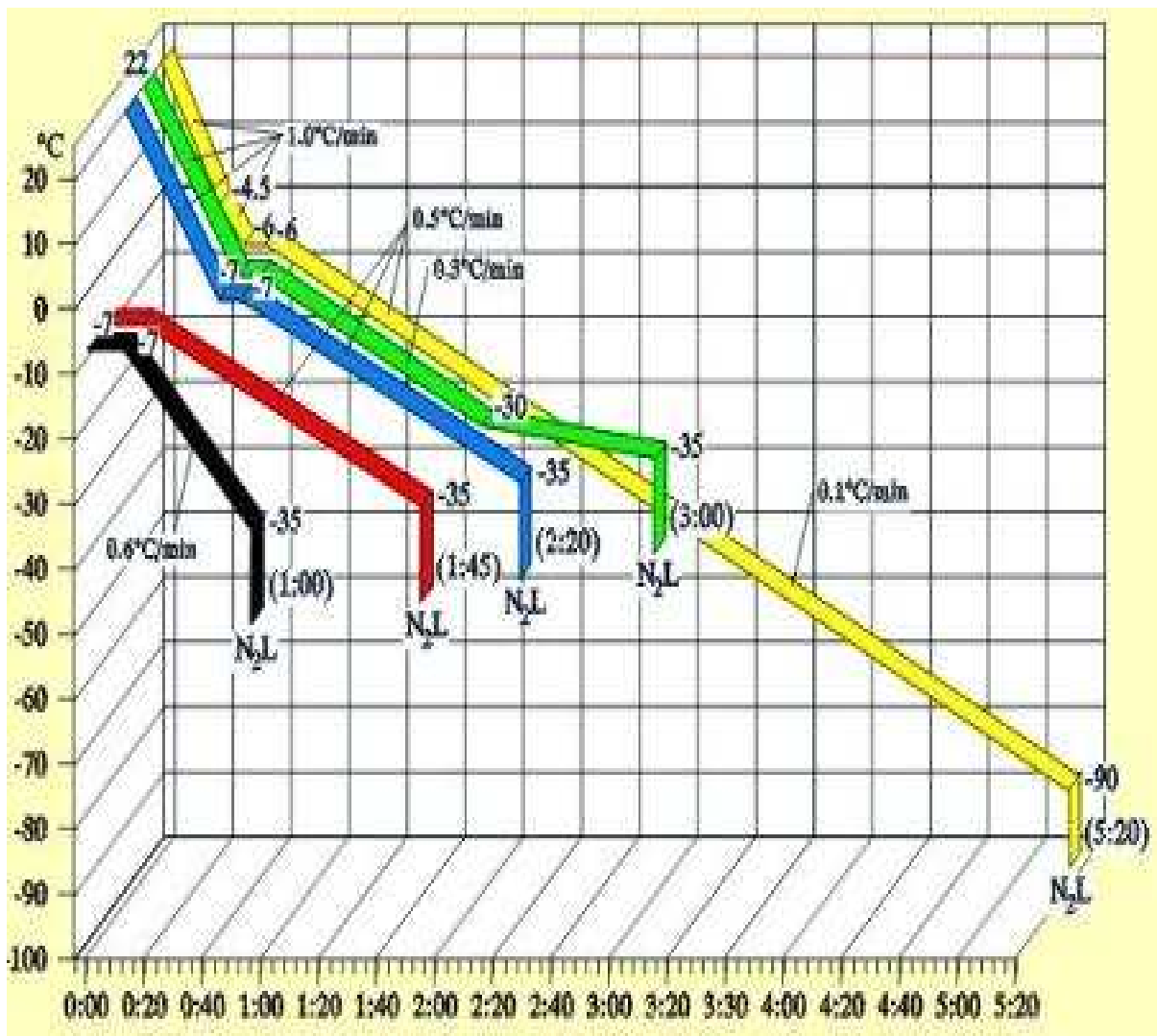


Gráfico 5. Entre las diferentes variaciones clasificadas, los porcentajes de sobrevivencia obtenidos han sido muy similares, lo que ha variado es la velocidad y temperatura final e inicial de congelación, llegándose a disminuir el tiempo de unas cinco horas inicialmente requerido a muy poco más de una hora.

## **F. MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS NO TRADICIONALES ULTRARAPIDOS**

Se usan crioprotectores penetrantes de 1.5 a 8.0 M asociados o no a crioprotectores no penetrantes 0.25 y 2.0 M. Se han desarrollado otros métodos (2 etapas, directa, ultrarrápida, vitrificación) basados en disminuir la deshidratación celular durante el congelamiento antes de sumergir los embriones en N<sub>2</sub>L.

### **1. Congelación en dos etapas.**

En embriones mamíferos la aplicaron Wood, D. y Farrant, R. (1980), con 1.5 M dimetilsulfóxido. Enfriaron los embriones hasta 0°C y colocaron ampolletas en baño de alcohol preenfriado a -9°C, mantuvieron la temperatura por 15 minutos y dos minutos después realizaron el seeding, posteriormente las transfirieron a otro baño de alcohol con temperatura constante de -20° o -25°C y se mantuvieron durante 10 a 30 min antes de ser sumergidas en N<sub>2</sub>L, gráfico 6.

### **2. Congelación directa.**

Nguyen, G. (1984), desarrollaron un método muy rápido buscando una rápida deshidratación del embrión exponiéndolo durante unos minutos a una solución 1.0 - 2.0 M glicerol + 0.5 - 1.0 M sucrosa; produciendo. Antes de la inmersión en N<sub>2</sub>L los embriones permanecen 30 minutos a -30°C. La velocidad de enfriamiento fue de 12°C/min. Con este método obtuvieron 63.3 % de sobrevivencia in vitro y 33.3 % de preñez en embriones bovinos. Los resultados de sobrevivencia embrionaria logrados con esta curva son buenos, aunque últimamente no se han publicado muchos trabajos que hayan aplicado esta técnica, gráfico 6.

### 3. Congelación ultrarrápida.

Se busca la deshidratación del embrión previa a su congelación, con la diferencia que luego de la exposición al crioprotector los embriones son sumergidos directamente en N<sub>2</sub>L o previamente expuestos durante unos segundos a vapores y luego sumergidos. No se necesitan sofisticados equipos de congelación, es muy práctica y no requiere de mucho tiempo. La congelación por este método es tan rápida que se forman cristales de hielo intracelular, pero tan pequeña, gráfico 6.

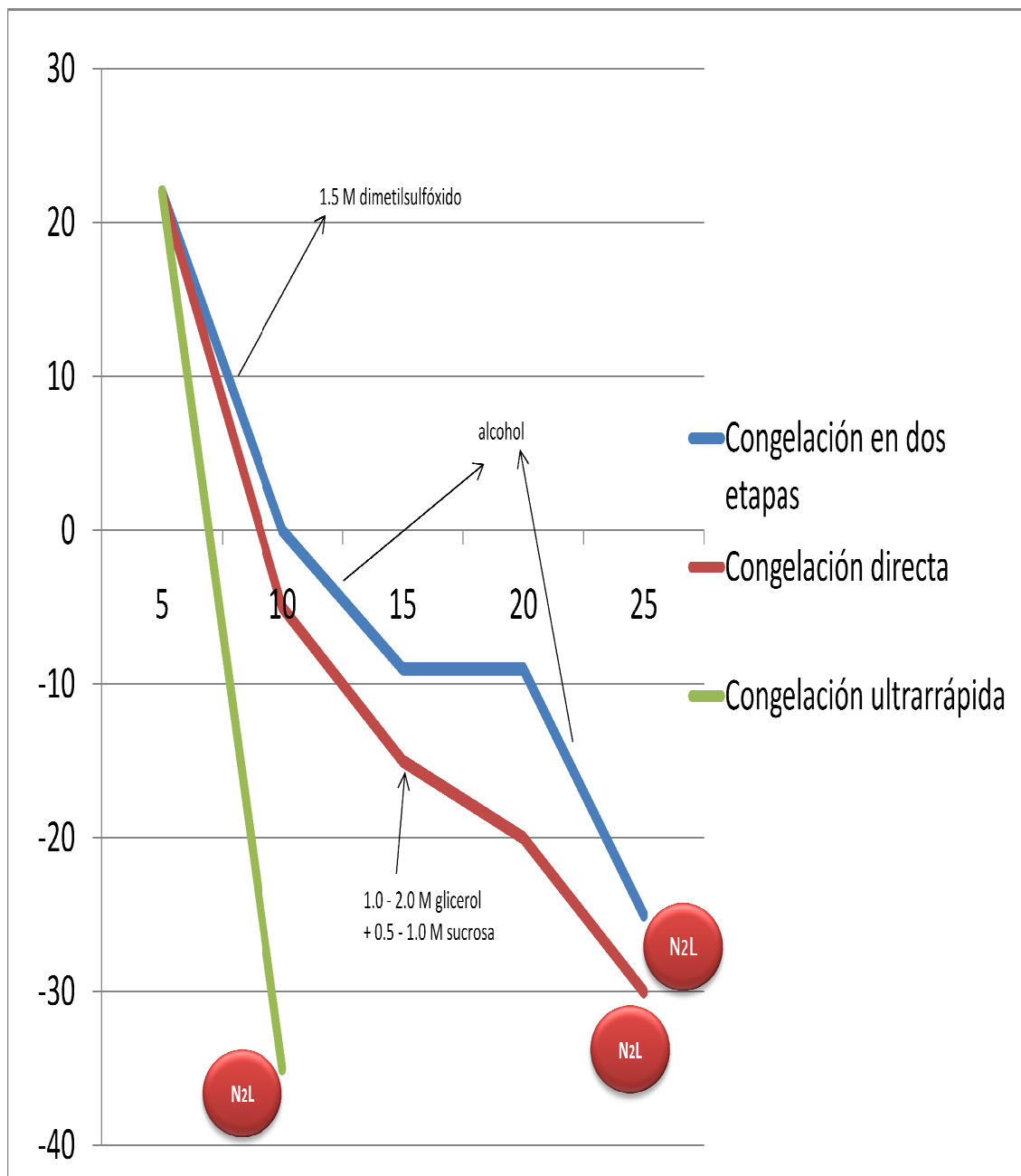


Gráfico 6. Métodos de Congelación no Tradicionales.

#### **4. Vitrificación.**

La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en NL no requiere más de 10 minutos.

Durante el proceso de vitrificación, el embrión está sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento.

Esto se debería a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor número de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va aumentando en los espacios que aún no se congelan. Este choque osmótico es conocido como “efecto solución”, y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia del embrión (Mazur, A. 1984), debido a la pérdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos.

El daño celular incluye pérdida de microvellosidades, destrucción de la membrana plasmática, cambios mitocondriales, hinchamiento del retículo endoplásmico, pérdida de uniones entre células así como fractura de zona pelúcida.

- Se carga un poco de diluyente en la pajilla.
- Se carga una columna de aire.
- Se carga el embrión con la solución 4.
- Se carga un poco de aire.
- Se carga diluyente hasta completar.

## **V. DISCUSIÓN**

Se han considerado que los métodos de conservación en cuanto a los métodos de congelación de embriones están clasificados en dos grandes grupos. a) curvas de enfriamiento tradicionales lentas a muy rápidas (lenta, rápida con enfriamiento en dos etapas, rápida con enfriamiento en una etapa, muy rápida y convencional) en las que se encuentran Congelación tradicional lenta, Congelación tradicional rápida con enfriamiento en dos etapas, Congelación tradicional rápida con enfriamiento en una etapa, Congelación tradicional muy rápida y la Congelación convencional. y b) curvas de enfriamiento no tradicionales de dos etapas a ultrarrápidas (dos etapas, directa, ultrarrápida y vitrificación), en las que se encuentran la Congelación en dos etapas, Congelación directa, la Congelación ultrarrápida y la Vitrificación.

### **A. DIFERENCIAS DE FECUNDACIÓN IN VITRO VS IN VIVO.**

Según Bavera, A. (2010), el medio ambiente en el que se desarrolla el embrión in vitro por congelación difiere sustancialmente del que existe en condiciones in vivo. Durante su desarrollo in vitro los embriones se ven expuestos a choques térmicos, fuentes luminosas, atmósfera gaseosa (5% de CO<sub>2</sub> en aire) y a unas condiciones de cultivo estáticas caracterizadas por una importante cantidad de medio rodeando al embrión que puede aportar un exceso, o bien carecer de los nutrientes necesarios.

Estas condiciones de cultivo, que permiten obtener los mejores porcentajes de embriones viables inducen diferencias fundamentales tanto desde un punto de vista morfológico como fisiológico que determinan que el comportamiento frente al frío sea diferente al de los embriones obtenidos in vivo, van reduciendo una viabilidad del al menos 10% in vitro, cuadro 3.

Cuadro 3. DIFERENCIAS ENTRE EMBRIONES PRODUCIDOS IN VIVO vs IN VITRO.

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

Fuente Bavera (2010).

## B. SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES POR CRIOPROTECTORES.

### 1. Porcentajes de Supervivencia de Embriones Bovinos entre dos Crioprotectores penetrantes.

Según Larocca, A. y Fernández, M. (2004) en su investigación realizada en Uruguay ejecutada mediante la utilización de dos alcoholes diferentes para el proceso de congelación entre el Etilenglicol y el Glicerol en Métodos Tradicionales, no se han tenido diferencias significativas es decir que existe una similitud en el número de embriones transferidos vs gestados, cuadro 4.

Cuadro 4. PORCENTAJES DE EMBRIONES GESTADOS BAJO DOS ALCOHOLES.

CRIOPROTECTOR	TRANSFERIDOS	GESTADOS	(P.100)
1,5 M etilenglicol	64	38	(59.3) <sup>a</sup>
1,36 M glicerol	58	31	(53,4) <sup>a</sup>
P > 0,05			

Fuente: Larocca A. (2004).

Según Mucci, N. Aller, J. Cabodevila, J. Kaiser, G. Hozbor, F. Alberio, R. Taurus, B. (2004), la sobrevida embrionaria poscriopreservación puede ser evaluada in vivo mediante su transferencia a hembras receptoras previamente sincronizadas este acumulo de investigaciones tienen la particularidad que se realizaron con embriones producidos in vitro u obtenidos in vivo evaluada mediante cultivo in vitro tomando en cuenta la zona preclucida del embrión, informada por diversos autores, cuadro 5.

Cuadro 5. PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO DOS ALCOHOLES.

AUTOR	ORIGEN	TIPO	CRIOPROTECTOR	% VIVOS
Trounson, J. 1978	In Vivo	Tradicional	Dimetilsulfoxido 1,5 M	55 – 61 <sup>a</sup>
Lehn, J. 1981	In Vivo	Tradicional	Glicerol 1,4 M	60 – 67 <sup>a</sup>

Fuente. UNICEN (2004).

Debemos considerar que el Origen de Embriones son provenientes de extracción o lavado In Vivo la diferencia mas clara esta en que cada autor designa una nueva concentración y tipo de crioprotector, en Métodos de Congelación Tradicionales, considerando que con el Dimetilsulfoxido 1,5 M bajo cultivo in vitro y con el Glicerol 1,4 M existen diferencias numéricas pero no significativas.

Por esa razón es claro determinar que la utilización de cualquier crioconservante no afecta a la viabilidad ni sobrevivencia del embrión mas bien simplemente cumplen con el requisito primordial de preservar en perfectas condiciones.



### C. SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES POR MÉTODOS DE CONGELACIÓN.

#### 1. **Porcentajes de Supervivencia de Embriones Bovinos entre Métodos Tradicionales de Congelación.**

Nuevamente se observa que el crioprotector no es un agente directamente relacionado con la congelación de embriones, por lo tanto deberíamos considerar que cualquier crioprotector que se utilice en el proceso de crioconservación para la congelación de embriones bovinos no afecta el resultado de supervivencia embrionaria bovina, cuadro 6.

Cuadro 6. PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO DOS ALCOHOLES EN EL MÉTODO TRADICIONAL MUY RÁPIDO.

AUTOR	ORIGEN	TIPO	CRIOPROTECTOR	% VIVOS
Voelkel, E. 1992	In vivo	Tradicional Muy Rápida	Etilenglicol 1,5 M	70 <sup>a</sup>
Leibo, E. 1984	In Vivo	Tradicionales Muy Rápida	Glicerol 1,5 M	67 <sup>a</sup>

Fuente. UNICEN (2004).

Debemos considerar que el Origen de Embriones son provenientes de extracción o lavado In Vivo de embriones en la Vaca donadora, la diferencia mas clara esta en que cada autor designa una misma concentración pero otro tipo de crioprotector para permitir el preservado, en Métodos Tradicionales Muy Rápido, es decir con un tiempo aproximado de dos horas para el proceso de congelación de embriones considerando que con el Etilenglicol 1,5 M y con el Glicerol 1,5 M existen diferencias numéricas pero no significativas, de igual manera en diferentes métodos de congelación de tipo tradicionales lo presenta en diferentes tiempos de congelación, cuadro 7.

Cuadro 7. PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO TRES MÉTODOS TRADICIONALES.

AUTOR	ORIGEN	TIPO	CRIOPROTECTOR	% VIVOS
Hochi, T. 1996	In vitro	Tradicional Convencional	Etilenglicol 1,5 M	96,3 <sup>b</sup>
Pugh, C. 1998	In vitro	Tradicional Rápida Dos Etapas	Etilenglicol 1,5 M	60,9 <sup>b</sup>
Sommerfield. H. y Niemann, C. 1999	In vitro	Tradicional Lenta	Etilenglicol 1,8 M	30 <sup>b</sup>

Fuente. UNICEN (2004).

Como podemos observar son tres Métodos Tradicionales de Congelación Convencional que tiene un proceso de duración de 1 hora, rápida a dos etapas que dura 3 horas aproximadamente y la convencional que dura 1 hora, esto nos indica que mucho tiene que ver la velocidad de Enfriamiento.

Mientras mayor velocidad de Enfriamiento mayor sobrevivencia embrionaria, nótese además que existen dos concentraciones diferentes de crioprotector.

Sin embargo existe cierta influencia entre el origen de la fecundación de los embriones en los mismos métodos de congelación, cuadro 8.

Cuadro 8. PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO UN MÉTODO TRADICIONAL CON DIFERENTE ORIGEN.

AUTOR	ORIGEN	TIPO	CRIOPROTECTOR	% VIVOS
Khurana H. y Niemann C., 2002	In Vitro	Tradicional	Glicerol 10%	36 <sup>b</sup>
		Rápida Dos Etapas		
	In Vivo	Tradicional	Glicerol 10%	80 <sup>b</sup>
		Rápida Dos Etapas		

Fuente. UNICEN (2004).

Debemos considerar que el Origen de Embriones son diferentes provenientes de extracción o lavado In Vivo y el otro por fecundación in vitro la diferencia es muy notoria ya que ambas tienen el mismo crioprotector en un mismo Método de Congelación Tradicional Rápida a Dos etapas, como se observa los embriones de origen in vivo tienen mayor sobrevivencia a diferencia de los invitro.

Por ello consideramos que si realizamos fecundación en el tracto reproductivo de la vaca tenemos mejores resultados a diferencia de realizar un proceso de fecundación fuera del tracto reproductivo, ya que como es lógico existe una contaminación directa con el medio ambiente gaseoso y contaminado al realizar la fecundación fuera del tracto reproductivo y sumariamos mayor número de embriones factibles para el proceso reproductivo.

## 2. Porcentajes de Supervivencia de Embriones Bovinos entre Métodos Tradicionales y No Tradicionales.

Debemos considerar que el Origen de Embriones son iguales en este caso in vitro es decir que a pasado por un proceso de fecundación externa pero el método es el que cambia un Tradicional con Etilenglicol 1,8 M como crioprotector mientras que Glicerol 1,3 mas Sacarosa 0,25 M en Métodos de Congelación no Tradicionales, obsérvese que no existen diferencias tan grandes pero en cuanto a

las tradicionales el % mínimo es de 50%, a diferencia del no tradicional que su mínimo reporta un porcentaje de 70%, cuadro 9.

Cuadro 9. PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO MÉTODOS TRADICIONALES Y NO TRADICIONALES.

AUTOR	ORIGEN	TIPO	CRIOPROTECTOR	% VIVOS
Kaidi , A. 2001	In Vitro	No Tradicionales	Glicerol 1,3 mas Sacarosa 0,25 M	70 <sup>a</sup> – 75 <sup>a</sup>
Abe, L. 2002	In vitro	Tradicionales	Etilenglicol 1,8 M	50 <sup>b</sup> – 74,7 <sup>a</sup>

Fuente. UNICEN (2004).

### 3. Porcentajes de Supervivencia de Embriones Bovinos entre Métodos No Tradicionales.

Debemos considerar que el Origen de Embriones son iguales además todos son Métodos de Congelación No tradicionales es decir ultrarapidos con la utilización de crioprotectores penetrantes y no penetrantes pero crioprotector es el que cambia por varias combinaciones, cuadro 10.

Cuadro 10. PORCENTAJES DE EMBRIONES SOBREVIVIENTES BAJO MÉTODOS NO TRADICIONALES.

AUTOR	ORIGEN	TIPO	CRIOPROTECTOR	% VIVOS
Kaidi, A. 2001	In Vitro	No Tradicionales	Glicerol 1,3 mas Sacarosa 0,25 M	75 <sup>a</sup>
Abe, L. 2002	In vitro	No Tradicionales	Etilenglicol 25% mas Glicerol 25% mas mas Sacarosa 0,5 M	73 <sup>a</sup>
Walker, S. 2005	In vitro	No Tradicionales	Etilenglicol 40% mas Galactasa 0,5 M mas Ficoll 18%	81 <sup>a</sup>

Fuente. UNICEN (2004).

Pero la supervivencia de los embriones si bien tienen diferencias numéricas no tienen diferencias significativas, con este resultado también estamos seguros que

en este tipo de Método tampoco influye el crioprotector utilizado en estos nuevos métodos de congelación o no tradicionales.

Por esta misma razón los crioprotectores que se han utilizado tienen diferentes combinaciones y dosis de empleo, considerando que estos métodos de congelación utilizan menos de una hora en su proceso de congelación embrionaria.

#### **4. Porcentajes de Preñez de Embriones Bovinos entre Métodos Tradicionales, No Tradicionales y Vitrificación.**

Como también podemos observar que a igual que en la sobrevivencia de embrión como en el Porcentaje de Preñez es mejor en Métodos más Rápidos de Congelación de Embriones pero también debemos tener en cuenta que en los niveles de preñez están dentro del rango aceptable o bueno, cuadro 11.

Cuadro 11. PORCENTAJES DE PREÑEZ EN CADA UNO DE LOS MÉTODOS DE CONGELACIÓN.

AUTOR	ORIGEN	Métodos Tradicionales	Métodos Tradicionales Vitrificación	No vitrificación sin
		% Preñez	% Preñez	% Preñez
Leibo, L. 1998	In Vivo	48 <sup>b</sup>	61 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>
	In Vitro	52 <sup>b</sup>	65 <sup>a</sup>	66 <sup>a</sup>

Fuente. URG (2004).

## VI. CONCLUSIONES

1. Existen nueve métodos de congelación de embriones de los cuales cinco son de tipo Tradicionales con un tiempo de congelación de 1 a 6 horas, tres métodos no Tradicionales con menos de 1 hora de congelación y la vitrificación que utiliza 10 minutos en su proceso.
2. Los Métodos de Congelación, tienen procedimientos diferentes pero fines comunes: la deshidratación osmótica de la célula antes del almacenamiento en nitrógeno líquido y prevenir efectos deletéreos por cambios o por químicos tóxicos en la congelación.
3. Hemos considerado que los métodos de congelación dependen del crioprotector que se utilice entre ellos en los Métodos Tradicionales se utilizan Crioprotectores penetrantes mientras que en los Métodos no tradicionales los crioprotectores no penetrantes o la combinación de ambos.
4. Con respecto al origen de la fecundación de los embriones sean in vitro, e In vivo para un proceso de congelación, los resultados mas favorables fueron los obtenidos por congelación de embriones fecundados in vivo a diferencia de los in vitro ya que en in vivo no son sometidos directamente al ambiente contaminado.
5. Dentro de las Técnicas de Congelación de embriones la vitrificación ha mostrado adaptarse de un modo muy promisorio teniendo en cuenta los resultados informados respecto a la a Métodos de Congelación Tradicionales y No tradicionales ya que el Tiempo de Congelación es Mínimo, a menor tiempo de congelación mayor sobrevivencia de embriones.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Es de vital importancia que se realice investigaciones en nuestro país siendo necesario desarrollar estas líneas de investigación de Congelación de Embriones ya que con ello pretender potencializar en el campo el efecto reproductivo de excelente génica.
2. Además que en nuestro País no existe reporte alguno de resultados obtenidos por congelación de Embriones y dentro de la técnica a nivel mundial se necesita estudiar sistemáticamente los daños moleculares y fisiológicos básicos de las células asociadas con la congelación.
3. Es Necesario que Ministerio de Agricultura de nuestro país y/o ONGs incentive un correcto proceso de crianza y trazabilidad animal con la finalidad de implantar estas tecnologías innovadoras para incentivar a mantener una correcta soberanía alimentaria de productos y subproductos de los Bovinos.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. ABE, L. YAMASHITA, A. ITOH, T. et al. Histochemical and ultraestructural evaluations of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media. EEUU. 1999. pp. 30-94.
2. ABE, L. YAMASHITA, A. ITOH, T. et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. EEUU 1999. pp. 234-246.
3. BAVERA, J. CÓRDOBA, O. Universidad Nacional de Río Cuarto . Facultad de Agronomía y Veterinaria, producción bovina de carne. República Argentina. Laboratorio de Producción Bovina 2004. pp. 23-26, 43-53.
4. CARNEVALE, E. ELDRIDGE, L. CARACCILO DI BRIENZA. et al. How to collect and vitrify embryos for direct transfer. 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver,CO, USA. 2004. pp. 234-246, 248-255.
5. ELDRIDGE, P. CARACCILO, D. CARNEVALE, A. et al. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified embryos, Denver,CO, USA. 2005. pp 50, 56, 88.
6. [http://www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/transplante\\_embrionario/08-congelacion\\_embriones.htm](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/transplante_embrionario/08-congelacion_embriones.htm)
7. <http://www.ria.asturias.es/RIA/bitstream/123456789/1553/1/congelacion.pdf> 2002.
8. [http://www.reprobiotec.com/libro\\_rojo/capitulo\\_09.pdf](http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_09.pdf) 2004.
9. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2006000200002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2006000200002&script=sci_arttext) 2004.
10. <http://www.albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3387/ART%C3%80DCULOS-RUMIANTES-ARCHIVO/.html>.



11. [http://www.engormix.com/MA-ganaderia\\_leche/genetica/foros/criopreservacion-congelacion-embriones-bovino-t16353/103-p0.htm](http://www.engormix.com/MA-ganaderia_leche/genetica/foros/criopreservacion-congelacion-embriones-bovino-t16353/103-p0.htm).
12. LAROCCA, A. FERNANDEZ, M. Investigación sobre utilización de dos alcoholes diferentes para el proceso de congelación entre el etilenglicol y glicerol como alcoholes Uruguay. 2004. pp. 23-26.
13. MORFORTE, C. Reproducción Animal, 1998 La Congelación de Embriones Bovinos en la Tecnología Agroalimentaria, Edición Especial, España. pp. 23-26, 58-62.
12. MOUSSA, M. BERSINGER, I. DOLIGEZ, P. et al. in vitro comparisons of two cryopreservation techniques for embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. , Denver, CO, USA. 2005. pp. 22-26.
13. MUCCI, N. ALLER, J. CABODEVILA, J. Tandil Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Lab. de Producción in vitro de Embriones, Depto. de Producción Animal. 2004. pp. 80-102.

# ANEXOS

## Anexo 1. SOBREVIVENCIA DEL EMBRIÓN CON MÉTODOS TRADICIONALES.

IN VITRO %	PREÑEZ%
Congelación tradicional lenta.	
33 - 80	25.7 - 44.4
Congelación tradicional rápida con enfriamiento en dos etapas.	
39 - 93	23 - 64
Congelación tradicional rápida con enfriamiento en una etapa.	
63	59
Congelación tradicional muy rápida.	
23.3 - 76.7	44.4 - 82
Congelación convencional.	
53.3 - 83.0	22.7

Fuente: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.(2003).

## Anexo 2. SISTEMA DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS EN NITRÓGENO LÍQUIDO.



Aquí se colocara la curva desea para la congelación.

### Anexo 3. SEEDING.



Consiste en la sujeción del extremo posterior de la pajuela almacenada con el embrión empapada de Nitrógeno Líquido para provocar una cristalización extracelular.

### Anexo 4. VITRIFICACIÓN.



Se coloca Crioprotectores en función a su densidad del menor hacia el mayor en cada uno de los 4 compartimentos y se sumergirá al embrión en cada uno de ellos para al final sellarlo en una pajuela.