

**CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES: UNA HERRAMIENTA BÁSICA
en la Reproducción Asistida**

Embryo Cryopreservation: A Basic Tool in Assisted Reproduction

Pedro Cabrera^{*,1} y Adriana Fernández^{*}

**Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), Apartado 4563, Maracay 2101, Estado Aragua,
Venezuela.*

Correo-E: cabrerap@ucv.ve

Recibido: 16/06/06 - Aprobado: 16/05/07

RESUMEN

Gracias a los avances desarrollados a nivel mundial en el campo de la reproducción asistida, es factible obtener un incremento en el número de embriones por ciclo estral de una hembra donadora élite, con la ayuda de tratamientos hormonales superovulatorios, logrando la preñez y el nacimiento de las crías al transferirlos a receptoras sincronizadas. De esta manera, se alcanza un mayor número de descendencias a partir de un animal con excelentes cualidades, tanto productivas como genéticas, logrando maximizar la explotación de la especie. Uno de los pasos, de suma importancia en este proceso denominado transferencia de embriones, lo constituye la criopreservación, ya que a través de esta técnica podemos conservar durante un prolongado período de tiempo un embrión de excelente calidad, permitiendo utilizarlo cuando y donde se produzcan las condiciones favorables para lograr la preñez de las hembras receptoras. Desde la primera criopreservación de embriones mamíferos lograda con éxito en los años 70, este campo ha alcanzado grandes avances, todos dirigidos a estandarizar técnicas simples y rápidas en su ejecución, económicas, aplicables a campo, y lo más importante, que ocasionen el menor daño posible al embrión. Debido a la importancia de la criobiología en la reproducción animal, la presente revisión desarrollará aspectos básicos de los distintos métodos de criopreservación de embriones disponibles en el ámbito mundial.

(Palabras clave: Ganado bovino, criopreservación, embrión)

ABSTRACT

As a result of the advances achieved worldwide in the field of assisted reproduction, it is feasible to obtain an increase in the number of embryos per estrous cycle from a female donor, using superovulation treatments. These embryos will be transferred to synchronized recipient females to become pregnant and get a higher number of offspring from an animal with excellent productive and genetic qualities. One of the most important steps during the process of embryo transfer is the cryopreservation of good quality embryos. With this technique, the embryos are preserved for a long period of time,

allowing them to be transferred at a give moment. Since the first cryopreservation of mammal embryos in the 70's, the field has reached a significant progress towards the standardization of the method, achieving a simple, fast, economic, and applicable technique; and, most importantly, without damage to the embryo. Due to the importance of cryobiology in animal reproduction, the following review will focus on basic aspects of the different methods of embryos cryopreservation throughout the world.

(Key words: Cattle, cryopreservation, embryo)

INTRODUCCIÓN

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

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

La criopreservación tiene como finalidad mantener al embrión en un estado de animación suspendida, deteniendo todos los procesos biológicos, incluyendo la actividad enzimática intercelular, la respiración celular, su metabolismo, además del crecimiento y multiplicación de la célula, logrando ser reanimado después de un corto o largo período de tiempo (Rall, 1992; Gordon, 1994; Tanaka *et al.*, 1997), sin perder su capacidad de desarrollarse y nacer vivo (Cabodevila y Teruel, 2001). Tal interrupción de la embriogénesis, constituye un poderoso método de control de la reproducción animal (Rall, 1992). Para su logro, es necesario el uso de bajas temperaturas, teniendo presente los fenómenos físicos y químicos involucrados en el congelamiento de la materia viva (Palasz y Mapletoft, 1996).

El tiempo que pueden permanecer viables los embriones criopreservados es aún incierto. Algunos autores como Gordon (1994) o Leibo y Songsasen (2002), plantean como factible la idea ambiciosa de mantener viable embriones a temperaturas de -196 °C en nitrógeno líquido durante quizás 1000 años o más.

En tal sentido, se ha reportado el nacimiento de bovinos provenientes de embriones criopreservados y almacenados durante 28 meses (Hruska, 1991), de conejos durante siete años (García *et al.*, 2000), de ovinos durante 13 años (Fogarty *et al.*, 2000) y la determinación del índice de apoptosis de embriones bovinos igualmente almacenados durante 16 años (Márquez-Alvarado *et al.*, 2004).

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

Todos los embriones presentan un daño morfológico y funcional durante la criopreservación. Por tal motivo, el propósito de los procedimientos de criopreservación consiste en minimizar dichos daños, los cuales pueden variar dependiendo de muchos factores, como el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de la membrana, la especie, el estadio de desarrollo, el origen y la calidad del embrión (Vajta y Kuwayama, 2006).

Cuando las células son congeladas, se encuentran sometidas a un estrés resultante de la interacción agua-soluto y a la elevación de la cristalización del hielo. La cristalización induce la formación de cavidades descongeladas de solución hiperosmótica, mientras que el enfriamiento progresa aproximadamente a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este proceso conlleva a la salida de agua intracelular, con la subsiguiente contracción de la célula. El proceso de descongelación involucra una reversión de estos efectos y el consecuente flujo de agua hacia el interior de la célula, puede causar disrupción de la membrana celular (Visintin *et al.*, 2002).

Desde las primeras experiencias de criopreservación con distintos tipos de células, se obtuvieron resultados prácticos de enorme interés. El enfriamiento, produce una disminución notable del metabolismo y del ahorro energético. Ambos fenómenos constituyen condiciones necesarias para la prolongación de la vida celular (Visintin *et al.*, 2002).

Así mismo, la inclusión de crioprotectores en los medios de congelación mejora notablemente la integridad estructural de las células, a pesar de la ligera toxicidad de algunos de ellos. Determinadas velocidades de descenso térmico, entre ciertos rangos de temperaturas, producen alteraciones perjudiciales que comprometen seriamente la vida celular, lo que da lugar a la formulación de protocolos de congelación donde se involucra el uso de distintos aditivos y velocidades de enfriamiento (Palasz y Mapletoft, 1996).

El desarrollo de estudios sobre criopreservación de embriones ha tenido una evolución más lenta, en comparación a la criopreservación del semen, seguramente por la mayor complejidad de las técnicas y por el mayor costo que involucra (Clement-Sengewald *et al.*, 1993). Sin embargo, en los últimos años la investigación a nivel mundial en esta área ha ido creciendo (Vajta y Kuwayama, 2006), reflejado por el mayor número de publicaciones en revistas especializadas y corroborado por el reporte de Roberts (2001), quien enumeró las necesidades de investigación en el área de la reproducción, ubicando a la criopreservación de embriones en segundo lugar, precedida por el sexaje de semen y seguida por el desarrollo tanto de la inseminación artificial, como de la sincronización del estro, el diagnóstico de preñez, la tecnología de animales transgénicos y la clonación animal.

Antecedentes de la criopreservación

La primera criopreservación exitosa de embriones fue reportada en la especie murina en 1972. Se utilizó una tasa lenta de congelación de $0,3$ a $2,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y una tasa lenta de descongelación de 4 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Dependiendo de la tasa específica de congelación y descongelación usada, de 2500 embriones murinos congelados, un 50 a 70% se desarrollaron hasta el estadio de blastocito en cultivo *in vitro*, luego de su almacenamiento a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante ocho días. De igual forma, se obtuvo un 65% de preñez y un 40% de nacimientos al ser transferidos a receptoras (Whittingham *et al.*, 1972).

Un año después, se logró el nacimiento del primer becerro procedente de un blastocito previamente criopreservado durante seis días en nitrógeno líquido, haciendo uso de una solución 2 M de dimetilsulfóxido y empleando una tasa de congelación y descongelación de $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $360\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectivamente.

En dicho experimento, se lograron colocar 17 de estos embriones después de la criopreservación en cultivo *in vitro* durante 24 horas antes de ser transferidos a hembras

receptoras, obteniéndose el nacimiento de un becerro de 36 kilogramos, de siete embriones que se lograron transferir (Wilmut y Rowson, 1973).

A partir de estos trabajos pioneros, fue realizada la primera congelación exitosa de embriones de conejo en 1974 (Prins y Fox, 1984). Seguidamente, fue lograda en la especie caprina en 1976 (Bilton y Moore, 1976).

En los équidos, los trabajos fueron iniciados en 1981, obteniéndose un embrión implantado luego de ser criopreservado, pero fue abortado a los 60 días de gestación, lográndose un año después el primer nacimiento en esta especie (Squires *et al.*, 1999).

Aplicaciones de la criopreservación de embriones

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

En el caso de los bovinos, constituye una herramienta útil para la industria de la transferencia de embriones, ya que el número de embriones puede ser fácilmente correlacionado con el número de receptoras disponibles en un momento apropiado del ciclo estral (Rall, 1992).

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

Los embriones necesitan ser descongelados cuando y donde las receptoras estén disponibles, lográndose una reducción en costos de mantenimiento de las mismas; a su vez, los embriones congelados pueden ser usados de manera análoga al semen congelado, pudiendo controlar la temporada de nacimientos y lograr un óptimo manejo del rebaño (Roa *et al.*, 1998).

También posibilita la transferencia de algunos embriones y la conservación del resto en bancos de germoplasma, hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia (Cabodevila y Teruel, 2001). Es importante señalar, que los embriones pueden mantenerse seguros y sanos en almacenamiento, así sus padres hayan adquirido alguna patología que les imposibilite reproducirse (Leibo, 1989; Martínez y Matkovic, 1998).

Los embriones congelados pueden ser transportados de un lugar a otro, facilitando el traslado a nivel nacional e internacional, ya que es factible importar y exportar material genético valioso a bajo costo con un mínimo riesgo de transmisión de enfermedades (Cabodevila y Teruel, 2001).

La transmisión potencial de enfermedades a través de los embriones es considerablemente menor que a través del semen o de animales vivos, gracias a la presencia de la zona pelúcida íntegra, aunado a un adecuado procedimiento de lavado del embrión, previo a la congelación (Sreenan, 1988; Shaw *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2002; Beebe *et al.*, 2002).

La congelación intenta asegurar que el embrión mantenga su capacidad de desarrollo, pero esto no asegura necesariamente un igual efecto sobre los patógenos asociados (Stringfellow y Givens, 2000).

El proceso de congelación y descongelación, produce una reducción en la viabilidad de agentes patógenos asociados al embrión; como ejemplo, cabe mencionar el caso de la *Brucella abortus* que después de la descongelación, se reduce su viabilidad en un 64% (Stringfellow *et al.*, 1986).

Por último, es importante señalar que los pequeños núcleos de animales domésticos autóctonos, son más vulnerables al riesgo de extinción y por tanto a la pérdida de la diversidad genética que llevan en su código genético.

La congelación de gametos y embriones de estos animales, ofrece la potencialidad de preservar el genoma animal mediante la creación de bancos de recursos genéticos, donde se mantengan a -196°C de forma indefinida (Vázquez *et al.*, 1998), con el objeto de tener germoplasma suficiente para recuperar estas razas aunque no quedase vivo ningún ejemplar puro (Fernández *et al.*, 1998).

Igualmente, se ha incrementado la frecuencia y urgencia de preservar gametos y embriones de especies amenazadas o en peligro de extinción y razas exóticas, en llamados «zoológicos congelados» o «arcas congeladas» haciendo alusión al arca de Noé, ya que se ha pronosticado que se habrán extinguido en las próximas décadas (Leibo y Songsasen, 2002).

Con relación a los roedores de laboratorio, la criopreservación de embriones constituye una vía importante para mantener la calidad e integridad de las colonias, protegiéndolas de un eventual accidente, como contaminación de las cepas o mutaciones (Pires *et al.*, 2002).

En tal sentido, permite la reposición inmediata de líneas que deban ser reestablecidas posterior a su pérdida por accidente, o bien establecidas por primera vez en un bioterio (García *et al.*, 2000; Jiménez, 2001). A su vez, permite mantener poblaciones de líneas con dificultades para criar a sus descendientes (capacidad reducida de producción de leche), ya que embriones post congelación son transferidos a hembras receptoras con capacidad de criar (Tada *et al.*, 1995).

El uso de bancos de embriones aunado a sistemas de transferencias de embriones, constituye un método efectivo para el control de enfermedades ya que puede utilizarse como punto de partida para el establecimiento de líneas libres de patógenos (Suzuki *et al.*, 1996; Jiménez, 2001).

Así mismo, la criopreservación constituye un método alternativo costo-eficiente para el mantenimiento en bancos de embriones de un gran número de líneas distintas en un espacio reducido, garantizando una disponibilidad continua de cepas usadas con poca frecuencia (Rall, 1992; Rülcke y Autenried, 1995; Jiménez, 2001).

En tal sentido, existen bioterios que han reportado el mantenimiento de más de un millón de embriones criopreservados de 1370 cepas en bancos de germoplasma (Leibo *et al.*, 1996), previniendo la extinción de líneas especialmente valiosas, siempre que éstas se conserven en más de un banco de embriones (Jiménez, 2001).

Igualmente, representa un método eficaz y económico para el transporte de material genético a lugares más distantes en el mundo (Suzuki *et al.*, 1996; Jiménez, 2001).

Procedimientos de criopreservación de embriones

Las estrategias desarrolladas para mejorar la sobrevivencia embrionaria post criopreservación han sido direccionadas en dos vías: En primer lugar, mediante la modificación del metabolismo del embrión, para así prevenir alteraciones celulares durante la criopreservación (Seidel, 2006); en segundo lugar, se han utilizado principios físicos para desarrollar nuevos procedimientos de criopreservación (Hansen, 2006). En tal sentido, se han reportado básicamente tres tipos de procedimientos para criopreservar embriones: la refrigeración, la criopreservación en equilibrio y la criopreservación no equilibrada (Gordon, 1994).

1. Refrigeración

La refrigeración es un método simple por medio del cual pueden mantenerse embriones a temperaturas entre 0 y 4 °C durante 24 a 72 horas (Gordon, 1994; Cabodevila y Teruel, 2001).

La refrigeración de embriones, se ubica como un paso intermedio entre la transferencia de embriones en fresco y conservados a -196 °C. Es un método utilizado cuando las receptoras se encuentran distantes de las donadoras, y también, para conservar embriones hasta que las receptoras asincrónicas alcancen la sincronización adecuada. Es una interesante herramienta considerando su simplicidad, logrando porcentajes de preñez que oscilan entre 44 y 50% en bovinos (Cabodevila y Teruel, 2001).

Además, se ha reportado que la presencia de células apoptóticas es similar a la encontrada en embriones equinos frescos y almacenados durante 24 horas a 5 °C (Moussa *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha observado (Matsushita *et al.*, 2004) que el almacenar los ovarios durante 24 horas a 10 °C, no afecta la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (68%) y su desarrollo a blastocito (25%), al compararlo con el control (68% y 27%, respectivamente).

2. Criopreservación en equilibrio

A pesar de los avances en criobiología, en la práctica, muy pocos protocolos han sido utilizados. La mayoría de los embriones de mamíferos son congelados, haciendo uso de métodos tradicionales, es decir, métodos de equilibrio, empleando un enfriamiento lento, un calentamiento rápido y crioprotectores de permeabilidad relativamente baja (Palasz y Mapletoft, 1996).

Cuando el embrión es expuesto a un crioprotector permeable, con una tasa de enfriamiento controlada, experimenta una primera contracción debido a una pérdida osmótica de agua, para lograr un equilibrio entre la solución intra y extracelular (Vajta y Kuwayama, 2006).

Como el aditivo penetra al embrión, éste gradualmente se reexpande a causa de la reentrada de agua para mantener el equilibrio osmótico. La tasa a la cual esta reexpansión ocurre, depende de la especie del embrión, el estadio de desarrollo embrionario, la relación volumen-área de superficie del embrión, el crioprotector *per se* y la temperatura de exposición (Leibo, 1989).

Cuando los embriones se suspenden en una solución de crioprotectores y son congelados por debajo de 0 °C, ocurren diversos cambios físicos, químicos y fisiológicos. A una temperatura usualmente por encima de -10 °C, se forma hielo espontáneamente, siendo factible la inducción artificial de hielo, a través de un proceso denominado «*seeding*» (Cabodevila y Teruel, 2001).

En consecuencia, la concentración de la solución extracelular se incrementa, tornándose los embriones impermeables a los crioprotectores a los cuales fueron libremente permeables a temperaturas por encima de 0 °C. El incremento de las concentraciones de soluto, causa en el embrión una segunda contracción osmótica debido a la pérdida de agua (Leibo, 1989).

Como su nombre lo indica, estos métodos de criopreservación deben lograr un «equilibrio» entre la tasa a la cual el agua se pierde de la célula (deshidratación) y la tasa

a la cual esa agua es incorporada a los cristales de hielo extracelular (Shaw y Jones, 2003; Vajta y Kuwayama, 2006).

En resumen, el proceso se inicia al suspender los embriones en soluciones con concentraciones relativamente bajas de agentes crioprotectores, aproximadamente 10% ó 1,5 M. Posteriormente, son cargados en pajuelas para su colocación en un congelador programable, donde se induce artificialmente la cristalización y se continúa el enfriamiento a tasas bajas de aproximadamente 0,5 a 2 °C /min (Niemann, 1991).

Seguidamente, los embriones son sumergidos y almacenados en termos de nitrógeno líquido, para finalmente, cuando sea necesario utilizarlos, estos son descongelados y los agentes crioprotectores removidos con el uso de azúcares (Leibo y Songsasen, 2002).

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

2.1 Criopreservación lenta: Todos los protocolos de criopreservación son diseñados con la finalidad de provocar deshidratación a las células, y de esta forma prevenir la formación de hielo intracelular o minimizar el daño que ésta causa (Shaw *et al.*, 2000; Visintin *et al.*, 2002).

En la criopreservación lenta, también llamada controlada, estándar o convencional, la deshidratación parcial de los embriones se logra a una temperatura de entre 20 a 25 °C. Los embriones son expuestos a soluciones conteniendo 10 a 11% (aproximadamente 1,5 M) de crioprotectores de bajo peso molecular, tales como el etilenglicol, el glicerol, el dimetilsulfóxido o el propilenglicol, hasta que se alcanza el equilibrio entre la solución del crioprotector y el embrión (Palasz y Mapletoft, 1996; Shaw *et al.*, 2000).

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

Este paso produce cambios pasajeros de contracción y expansión del embrión a medida que el crioprotector penetra a la célula (Rall, 1992). De esta manera refleja su respuesta osmótica ante un ambiente hiperosmótico, considerando estos movimientos del embrión como indicadores de viabilidad (Niemann, 1991).

Si bien cada crioprotector tiene mecanismos propios de acción, sus efectos generales son: estabilizar las membranas celulares, producir la salida de agua intracelular del embrión, reducir la concentración de electrolitos del medio extracelular y disminuir la temperatura a la cual ocurre la congelación intracelular (Gordon, 1994; Cabodevila y Teruel, 2001).

Luego de envasar los embriones en pajuelas de 250 o 500 mL, éstas se colocan en congeladores programables, siendo el equipo mas costoso en un programa de criopreservación (Gordon, 1994).

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

Por el contrario, si la tasa de enfriamiento es rápida, el agua no alcanza a salir del interior de las células, produciéndose la formación de cristales de hielo en el espacio

intracelular. Si la descongelación posterior es lenta, estos cristales sufren un crecimiento adicional, provocando un daño mecánico que compromete la vida celular (Cabodevila y Teruel, 2001).

Las pajuelas son mantenidas a una temperatura de -5 a -7 °C, durante aproximadamente cinco minutos (Palasz y Mapletoft, 1996). Cuando la temperatura alcanza los -10 ó -15 °C, en la solución de congelación se forma hielo de manera espontánea, produciéndose un aumento brusco de temperatura denominado calor latente de fusión.

Para evitar este fenómeno perjudicial para los embriones, se induce la formación artificial de cristales de hielo. Esta maniobra denominada «*seeding*», se realiza entre -4 y -7 °C tocando la pajuela con una pinza enfriada previamente a -196 °C o de manera automática en algunos equipos programables (Cabodevila y Teruel, 2001). Con el crecimiento de cristales de hielo, el agua de la solución es convertida de un estado líquido a uno sólido y esto incrementa las concentraciones de soluto, lo cual atrae más agua al exterior de las células (Shaw *et al.*, 2000).

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

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

La descongelación se realiza con velocidades de calentamiento aproximadas a los 250 °C/min. Luego se remueve el crioprotector a temperatura ambiente antes del cultivo o transferencia del embrión (Palasz y Mapletoft, 1996).

Para que las blastómeras soporten (continúen viables) el proceso de congelación y descongelación, debe evitarse el daño de las mismas y deben permanecer fisiológicamente funcionales durante el proceso completo. Por lo tanto, cada paso es absolutamente crítico (Palasz y Mapletoft, 1996).

2.2 Criopreservación en un paso: Desde el momento en que se demostró que la sucrosa podía ser utilizada para retirar el crioprotector de los embriones, surgió la posibilidad de diseñar una técnica de extracción que se adaptara al trabajo en condiciones de campo. Para evitar que durante la extracción del crioprotector el embrión esté en contacto con el medio externo, Leibo en 1982 y Renard *et al.* en el mismo año (citados por Cabodevila y Teruel, 2001), implementaron el denominado método de congelación de embriones en un paso o «*one-step*».

Este procedimiento se basa en el uso de un crioprotector no permeable, como la sucrosa, que permite la remoción de un crioprotector permeable, como el glicerol. Con esta técnica, se pueden transferir los embriones directamente a la hembra receptora sin la necesidad de una evaluación microscópica previa a la transferencia y sin el repetido *shock* osmótico que sufren las células cuando se usa el método en etapas; de esta manera se simplifica el procedimiento de dilución o extracción del crioprotector (Palasz y Mapletoft, 1996). No obstante, al prescindir de la evaluación morfológica post

descongelación, es razonable esperar que los resultados de preñez sean inferiores (Cabodevila y Teruel, 2001). En este caso, los medios de congelación (1,5 M de glicerol) y dilución (0,5 a 1,0 M de sucrosa) son incluidos en la misma pajuela, pero separados por burbujas de aire. Después de la descongelación, la pajuela se agita con el fin de mezclar ambas soluciones y de esta forma el glicerol abandona el embrión como resultado del gradiente de concentración causado por la solución de sucrosa (Palasz y Mapletoft, 1996).

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

Esta técnica representa una gran ventaja práctica, dado que posibilita transferir embriones congelados de manera similar a lo que ocurre con la inseminación artificial (Cabodevila y Teruel, 2001).

La tasa de preñez lograda con este método se aproxima a la que se alcanza con las técnicas tradicionales, pero los resultados son variables. Pareciera ser, que la causa principal de esta variabilidad se debe a la dificultad de mezclar ambas soluciones crioprotectoras dentro de la pajuela (Palasz y Mapletoft, 1996).

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

2.3 Criopreservación con transferencia directa: Una versión del método en un paso, es llamado método con transferencia directa, en el cual se emplean crioprotectores altamente permeables tales como el etilenglicol o el 1,2 propilenglicol.

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

Este método simplifica sustancialmente el procedimiento de la transferencia embrionaria, ya que permite la transferencia de los embriones directamente al útero de las receptoras, sin extraerlos de la pajuela en la que fueron congelados. Además, reduce el tiempo requerido para realizar la técnica y disminuye los costos (Palasz y Mapletoft, 1996).

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

3. Criopreservación no equilibrada

El término no equilibrada, se usa para describir la criopreservación por procedimientos en los cuales las células y los tejidos no están en equilibrio con las altas concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables, antes de un enfriamiento rápido.

Las altas concentraciones de crioprotectores causan una rápida deshidratación de las células y el enfriamiento ocurre antes del equilibrio osmótico entre el medio y el embrión (Vajta y Kuwayama, 2006).

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

En resumen, las células son suspendidas muy brevemente en soluciones con altas concentraciones de una mezcla de agentes crioprotectores, aproximadamente más del 40% ó 6 a 8 M, y enfriadas a tasas altas, mayores a 500 °C/min (Leibo y Songsasen, 2002).

Los procedimientos no equilibrados de criopreservación poseen dos variantes: la criopreservación rápida y la vitrificación, dependiendo si forma o no hielo en la solución durante la criopreservación (Shaw *et al.*, 2000).

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

Después de un período de equilibrio (30 segundos a 3 minutos), los embriones en un estado parcialmente deshidratado son enfriados en temperaturas intermedias de -21°C durante 35 minutos antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido (Cabodevila y Teruel, 2001).

En contraste con la vitrificación, el agua extracelular se congela y la osmolalidad de la solución de congelación aumenta, causando mayor pérdida de agua desde las blastómeras del embrión (Palasz y Mapletoft, 1996).

La criopreservación de embriones bovinos por esta técnica ha proporcionado tasas de supervivencia bajas (33,3%), si se compara con los métodos convencionales de congelación lenta o de vitrificación (Palasz y Mapletoft, 1996).

3.2 Vitrificación: La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en una solución altamente concentrada de crioprotectores, solidificándose durante el enfriamiento sin la formación de cristales de hielo (Vajta y Kuwayama, 2006). En condiciones prácticas, esto se logra mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido, representando una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2500 °C/min, demorándose así pocos segundos en criopreservarse. La solución no se cristaliza, se vitrifica, es decir, aumenta abruptamente su viscosidad y se transforma a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, por el cual el método toma su denominación. De esta manera, se conserva la distribución normal tanto molecular como iónica del estado líquido (Tanaka *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 2000).

La vitrificación se evidencia por la formación de una estructura sólida de apariencia clara, la cual es transformada durante el calentamiento a un estado líquido, sin la presencia de una apariencia lechosa, la cual podemos observarla en los procesos de cristalización o formación de hielo (Shaw y Jones, 2003; Silva y Berland, 2004).

Criopreservación de embriones en Venezuela

En Venezuela, son muy pocas las publicaciones con relación a la criopreservación de embriones. Sólo existen algunos trabajos de transferencia de embriones en la especie bovina haciendo uso de embriones criopreservados.

En tal sentido, se han logrado tasas de preñez de 30% (González *et al.*, 1983) y en otros estudios de 45,7% (Darrow, 1989), resaltando que estas tasas razonables son logradas transfiriendo embriones criopreservados en condiciones tropicales.

Otras experiencias realizadas en el país, involucran asociaciones estratégicas entre las universidades y la empresa privada (Universidad Central de Venezuela, Universidad de Florida-USDA y la asociación de criadores de ganado romosinuano), logrando exportar embriones congelados de un país con alta incidencia de fiebre aftosa como el nuestro, a uno libre de esta enfermedad como los Estados Unidos de América (Chase, 1996).

De igual forma, se logró la acción inversa, es decir, producir embriones bovinos *in vitro* con medios químicamente definidos en Estados Unidos y criopreservados para su transporte hasta Venezuela, para luego ser transferidos a receptoras, logrando el nacimiento de becerros F1 Brahman x Holstein (Hernández-Fonseca *et al.*, 2002). Estas experiencias corroboran el potencial de estas técnicas biotecnológicas capaces de transportar germoplasma de manera segura.

Más recientemente, se aplicó por primera vez en el país la técnica de vitrificación en embriones murinos, obteniéndose altos porcentajes de viabilidad morfológica post vitrificación (90,4%) y bajas tasas de anomalías morfológicas (9,6%), sirviendo este trabajo de base para la implementación de esta técnica a especies de mayor interés económico como los bovinos (Cabrera, 2005; Cabrera *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

La criopreservación de embriones representa un paso crucial en los procedimientos de reproducción asistida, la cual permite disponer de un germoplasma valioso en el momento más óptimo para su utilización.

La congelación lenta constituye aún, la técnica más frecuentemente usada para la criopreservación de embriones, debido a que el protocolo para su ejecución está mundialmente estandarizado. Sin embargo, técnicas de mas reciente aparición como la vitrificación surgen como una alternativa factible que permite reducir el tiempo y los costos de la criopreservación, además de eliminar los daños provocados por la formación de hielo intracelular (Esaki *et al.*, 2004).

Actualmente existe gran variabilidad de las mezclas crioprotectoras y de los dispositivos donde son contenidos los embriones para el enfriamiento, lo cual dificulta la masificación de este procedimiento, debido a que no existe un protocolo universal de vitrificación (Vajta y Kuwayama, 2006). A pesar de todos estos obstáculos, la técnica de vitrificación estandarizada y mejorada ha presentado satisfactorios resultados y puede reemplazar en un futuro cercano a los ya tradicionales métodos lentos de criopreservación (Stehlik *et al.*, 2005; Vajta y Nagy, 2006).

REFERENCIAS

Aller, J.F.; Rebuffi, G.E.; Cancino, A.K.; Alberio, R.H. 2002. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 73:121-127.

- Beebe, L.F.S.; Cameron, R.D.A.; Blackshaw, A.W.; Higgins, A.; Nottle, M.B. 2002. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology*, 57:2155-2165.
- Bilton, R.J.; Moore, N.W. 1976. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sc.*, 29:125-129.
- Cabodevila, J.; Teruel, M. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En: *Biotechnología de la reproducción* (G. A. Palma, eds.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina, Capítulo X, pp. 49-174.
- Cabrera, P. 2005. Vitrificación de embriones murinos obtenidos *in vivo*. Tesis de Maestría, Postgrado en Reproducción Animal y Tecnología de la Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela, 100 p.
- Cabrera, P.; Fernández, A.; Díaz, T.; Bastidas, P.; Molina, M.; Bethencourt, A.; Vivas, I.; Reyes, Y.; Perozo, E.; Sifonte, F. 2006. Effect of vitrification on the morphological viability of murine embryos in Venezuela. En: *Proceedings of the 39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, SSR, Omaha Nebraska, 181 p.
- Chase, Jr. C.C. 1996. The whole animal approach to the study of bovine. *J. Anim. Sci.*, 74 (Suppl. 1):235 (Abstr.).
- Clement-Sengewald, A.; Palma, G.A.; Brem, G. 1993. Biotecnología aplicada a la producción animal. En: *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina* (G. A. Palma y G. Brem, eds.). Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, Capítulo I, pp. 13-24.
- Darrow, M.D. 1989. Transfer of imported embryos to zebu recipients in tropical Venezuela. *Theriogenology*, 31:182 (Abstr.).
- Esaki, R.; Ueda, H.; Kurome, M.; Hirakawa, K.; Tomii, R.; Yoshioka, H.; Ushijima, H.; Kuwayama, M.; Nagashima, H. 2004 Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.*, 71:432-437.
- Fernández, M.; Rivero, C.J.; Fernández, A.; Viana, J.L. 1998. Conservación *in vitro* de las razas vacunas Morenas Gallegas: Banco de semen y embriones congelados. *Arch. Zootec.*, 47:359.
- Fogarty, N.M.; Maxwell, W. M. C.; Eppleston, J.; Evans, G. 2000. The viability of transferred sheep embryos after long-term cryopreservation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12:31-37.
- García, M.L.; Baselga, M.; Viudes, M.P.; Vicente, J.S. 2000. Reconstitución de una línea de conejos a partir de embriones crioconservados. *Arch. Zootec.*, 49:81-86.
- González, R.; Soto, E.; Bohorquez, R. 1983. Bovine embryo transfer in Venezuela. *Theriogenology*, 19:130 (Abstr.).
- Gordon, I. 1994. Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. En: *Laboratory production of cattle embryos* (I. Gordon, eds.). Cab International, Cambridge, UK, Capítulo 6, pp. 293-328.
- Gordon, I. 1996. Transferencia de embriones y técnicas asociadas en el ganado vacuno. En: *Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos* (I. Gordon, eds.). Acribia, Zaragoza, España, Capítulo 7, pp. 255-385.
- Hansen, P.J. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. *Theriogenology*, 65:119-125.
- Hernández-Fonseca, H.; Sirisathien, S.; Soto-Belloso, E.; Velarde, J.C.; González, R.; Bosch, P.; Lott, J.D.; D'Ondiz, A.; Brackett, B.G. 2002. Crossbred calves resulting under tropical conditions after direct transfer of cryopreserved F1 embryos produced in chemically defined media. *Theriogenology*, 57:670 (Abstr.).
- Hruska, K. 1991. The effect of length of cryopreservation on the viability of bovine embryos in a commercial operation. *Theriogenology*, 36:477-484.

- Jiménez, R. 2001. Estandarización genética, transgenización y clonación. En: *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal* (J.M. Zúñiga; J.A. Tur Marí; S.N. Milocco y R. Piñeiro, eds.). Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, España, Capítulo 7, pp. 179-202.
- Kasai, M.; Ito, K.; Edashige, K. 2002. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum. Reprod.*, 17:1863-1874.
- Leibo, S.P. 1989. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 31:85-93.
- Leibo, S.P.; Martino, A.; Kobayashi, S.; Pollard, J.W. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.*, 42:45-53.
- Leibo, S.P.; Songsasen, N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57:303-326.
- Loneragan, P. 1994. Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta Vet. Scand.*, 35:307-320.
- Márquez-Alvarado, Y.; Galina, C.; Castilla, B.; León, H.; Moreno-Mendoza, N. 2004. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the TUNEL technique. *Reprod. Domest. Anim.*, 39:141-145.
- Martínez, A. G.; Matkovic, M. 1998. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 49:1039-1049.
- Matsushita, S.; Tani, T.; Kato, Y.; Tsunoda, Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 84:293-301.
- Moussa, M.; Tremoleda, J.L.; Duchamp, G.; Bruyas, J.F.; Colenbrander, B.; Bevers, M.M.; Daels, P.F. 2004. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 degrees C. *Theriogenology*, 61:921-932.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 35:109-124.
- Palasz, A.T.; Mapletoft, R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, 14:127-149.
- Pires, L.A.; Dini, T.H.C.; Santana, T.M.; Passos, L.A.C.; Guaraldo, A.M.A. 2002. Establishment and operation of a mouse and rat embryo bank. En: *Proceedings of the 53rd AALAS National Meeting*, AALAS, San Antonio Texas, pp. 134-135.
- Prins, J.B.; Fox, R.R. 1984. A successful technique for the preservation of rabbit embryos. *Lab. Anim.*, 34:484-487.
- Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:237-245.
- Roa, N.; Linares, T.; Tamasaukas, R. 1998. Métodos y aplicaciones de la criopreservación de oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos. Una revisión. *Rev. Científica FCV - LUZ*, VIII:40-52.
- Roberts, R.M. 2001. The place of farm animal species in the new genomics world of reproductive biology. *Biol. Reprod.*, 64:409-417.
- Rülicke, Th.; Autenried, P. 1995. Potential of two-cell mouse embryos to develop to term despite partial damage after cryopreservation. *Lab. Anim.*, 29:320-326.
- Seidel, G.E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 65:228-235.
- Shaw, J.M.; Jones, G.M. 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update*, 9:583-605.

- Shaw, J.M.; Oranratnachai, A.; Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59-72.
- Silva, M.E.; Berland, M.A. 2004. Vitrificación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte. *Arch. Med. Vet.*, 36:79-85.
- Squires, E.L.; McCue, P.M.; Vanderwall, D. 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51:91-104.
- Sreenan, J.M. 1988. Embryo transfer: Its uses and recent developments. *Vet. Rec.*, 122:624-629.
- Stehlik, E.; Stehlik, J.; Katayama, K.P.; Kuwayama, M.; Jambor, V.; Brohammer, R.; Kato, O. 2005. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod. Biomed. Online*, 11:53-57.
- Stringfellow, D.A.; Givens, M.D. 2000. Preventing disease transmission through the transfer of *in vivo* derived bovine embryos. *Livest. Prod. Sci.*, 62:237-251.
- Stringfellow, D.A.; Wolfe, D.F.; McGuire, J.A.; Lauerman, L.H.; Gray, B.W.; Sparling, P. H. 1986. Effects of embryo-freezing and thawing techniques on the survivability of *Brucella abortus*. *Theriogenology*, 26:553-559.
- Suzuki, H.; Nakagata, N.; Anzai, M.; Tsuchiya, K.; Nakura, M.; Yamaguchi, S.; Toyoda, Y. 1996. Transport of wild mice genetic material by *in vitro* fertilization, cryopreservation, and embryo transfer. *Lab. Anim.*, 46:687-688.
- Tada, N.; Sato, M.; Mizorogi, T.; Kasai, K.; Ogawa, S. 1995. Efficient cryopreservation of hairless mutant (bald) and normal wistar rat embryos by vitrification. *Lab. Anim.*, 45:323-325.
- Tanaka, H.; Ballarales, P.; Masaki, J.; Kanagawa, H. 1997. Biotécnicas con embriones. En: *Teoría y práctica de la fecundación in vitro* (H. Tanaka; P. Ballarales; J. Masaki y H. Kanagawa, eds.). Agencia de Cooperación Internacional del Japón, Valdivia, Chile, Capítulo V, pp. 59-80.
- Vajta, G.; Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
- Vajta, G.; Nagy, Z.P. 2006. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod. Biomed. Online*, 12:779-796.
- Van Zutphen, L.F.M.; Hedrich, H.J.; Van Oortmerssen, G.A.; Prins, J.B. 1993. Genetic Standardization. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. En: *Principles of Laboratory Animal Science* (L.F.M. Van Zutphen; V. Baumans y A.C. Beynen, eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, Capítulo 7, pp. 127-142.
- Vázquez, Y.; Borque, C.; Díaz, C. 1998. Criobiología aplicada a Reproducción Animal. *Arch. Zootec.*, 47:375 (Abstr.).
- Visintin, J.A.; Martins, J.F.P.; Bevilacqua, E.M.; Mello, M.R.B.; Nicacio, A.C.; Assumpção, M.E.O.A. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different?. *Theriogenology*, 57:345-359.
- Whittingham, D.G.; Leibo, S.P.; Mazur, P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*, 178:411-414.
- Wilmot, I.; Rowson, L.E.A. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 92:686-690.