

CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS

Mucci, N.(1), Aller, J.(1), Cabodevila, J.(2), Kaiser, G.(1), Hozbor, F.(1) y Alberio, R.H.(1). Taurus, Bs. As., 7(26):20-35.

(1) Lab. de Producción in vitro de Embriones, Depto. de Producción Animal, E.E.A. INTA Balcarce.

(2) Área de obstetricia, Fac. Cs. Vet., UNICEN., Tandil, Argentina.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Transferencia embrionaria](#)

RESUMEN

El mayor obstáculo para la aplicación comercial en gran escala de los embriones producidos in vitro es la falta de métodos adecuados para su conservación, debido fundamentalmente a que éstos son más sensibles a los procesos de criopreservación que aquellos obtenidos por superovulación. Se han propuesto dos enfoques para mejorar la sobrevivencia poscriopreservación de los embriones obtenidos in vitro, el primero a través del perfeccionamiento de los sistemas de criopreservación (fundamentalmente la congelación convencional y la vitrificación, y el segundo mediante la formulación de medios de cultivo que permitan obtener embriones de mejor calidad (asemejándolos a los producidos in vivo). El propósito de este artículo es revisar los mencionados procedimientos de criopreservación y describir cuáles son las alteraciones embrionarias que ellos generan a nivel estructural, ultraestructural y metabólico.

Palabras Clave: embriones, bovinos, congelación, vitrificación, crioinjurias.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los métodos más utilizados para criopreservar embriones son la congelación convencional y la vitrificación. La primera es considerada la técnica de elección para la criopreservación de embriones bovinos producidos in vivo. En este tipo de embriones, la congelación convencional ha permitido obtener resultados ligeramente inferiores a los registrados con embriones en fresco (44).

Al mismo tiempo, la introducción del etilenglicol como crioprotector permitió desarrollar la técnica de transferencia directa de embriones congelados/descongelados (procedimiento similar a la inseminación artificial), posibilitando la aplicación de esta técnica en condiciones de campo, sin necesidad de remover el o los crioprotectores utilizados (90).

Durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intra o extracelular que pueden disminuir la sobrevivencia poscriopreservación. Para poder minimizar estos problemas, se ha recurrido al uso de "sustancias crioprotectoras", así como a tasas de descenso térmico controladas mediante la utilización de máquinas congeladoras programables de alto costo.

El proceso de vitrificación fue investigado por primera vez por Tammann en 1898, pero Luyet, 60 años más tarde, reconoció el potencial de alcanzar un estado libre de hielo durante la criopreservación (34). En 1985, Rall y Fahy (69) introdujeron la técnica de vitrificación en la conservación de embriones, la cual presenta algunas ventajas importantes respecto a la congelación convencional, como son: no hay formación de cristales de hielo, mayor rapidez en el procesamiento de cada muestra, y menor costo, por prescindir de máquinas congeladoras programables. Debido a esto, la vitrificación constituye una herramienta interesante capaz de reemplazar a la congelación convencional, especialmente cuando se intenta conservar embriones sensibles a la criopreservación, como son los producidos in vitro (40, 66).

2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE LAS SOLUCIONES ACUOSAS

2.1. Congelación

Para que un líquido cristalice se requiere la presencia de "núcleos" sobre los cuales la fase líquida pueda condensarse. En el agua pura, grupos de moléculas unidas por puente de hidrógeno actúan como núcleos de cristalización (nucleación homogénea), aunque otras sustancias (proteínas, minerales, etc.) también pueden actuar como núcleos (nucleación heterogénea) (96). De este modo, la formación de cristales se lleva a cabo mediante un proceso de "desarrollo" de núcleos seguido por uno de agregación de moléculas de agua desde la fase líquida a la sólida en una zona de interfase, denominado "crecimiento".

El proceso de congelación podría resumirse mencionando que a medida que una solución acuosa se enfría por debajo de 0° C disminuye el movimiento molecular, sobreenfriándose hasta alcanzar una masa crítica de núcleos, momento en el cual se libera el calor latente de cambio de estado (4). Uno de los efectos de la cristalización en las soluciones acuosas es remover agua de la solución, ya que los cristales que se forman están compuestos por agua pura, por lo cual la solución remanente, que permanece sobreenfriada, se concentra. De este modo, esta nueva solución permanece líquida hasta que se alcanza, mediante una mayor extracción de calor, el nuevo punto de

equilibrio de congelamiento. Este proceso se repite hasta que a una determinada temperatura, denominada eutéctica o "punto eutéctico", la fase líquida remanente y los solutos solidifican (4, 89).

2.2. Vitrificación

El estado vítreo, es aquel alcanzado por el rápido enfriamiento de un medio líquido en ausencia de cristales de hielo y con una elevada viscosidad (69). Esta solución adquiere un aspecto amorfo similar al vidrio, del cual toma su denominación.

Los factores que afectan la probabilidad de vitrificación de una solución son la viscosidad inicial, su volumen y la tasa de enfriamiento a la cual es sometida (7). Según Wolfe y Bryant (94), la adición de distintos solutos disminuye la probabilidad de nucleación y crecimiento de los cristales de hielo por dos razones:

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

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

La desvitrificación, corresponde a la cristalización que se produce en un sistema previamente vitrificado. Este proceso se lleva a cabo debido a que durante el calentamiento se atraviesa nuevamente la temperatura óptima para que se establezca la nucleación, la cual es más baja que la requerida para el crecimiento de los cristales de hielo. Por tal motivo, cuando se revierte el estado vítreo, se utiliza el término calentamiento y no desvitrificación.

Durante la vitrificación no se establece un verdadero cambio de fase, por lo cual no se produce liberación de calor latente ni cristales de hielo, los cuales constituyen aspectos muy importantes para su aplicación en la preservación de estructuras biológicas.

3. CONGELACIÓN DE EMBRIONES

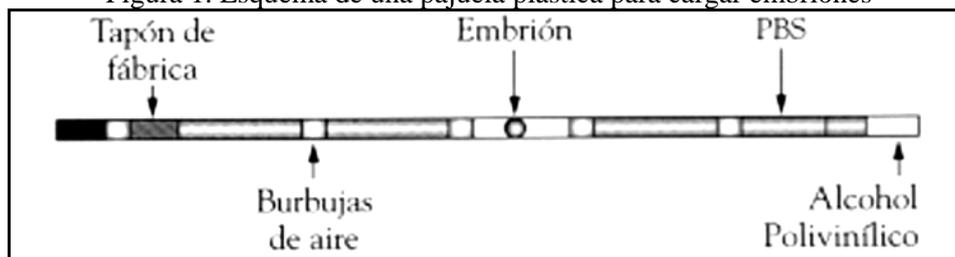
Según Massip y col. (49) y Niemann (58), los pasos generales durante el proceso de congelación-descongelación de embriones pueden resumirse de la siguiente manera:

***Exposición de los embriones a las soluciones de congelación.** Los embriones son congelados generalmente en una solución salina tamponada fosfato (PBS) suplementada con proteínas o macromoléculas (suero bovino, albúmina bovina [BSA]), a la cual se le adiciona sustancias denominadas crioprotectoras, que modifican el comportamiento físico de la solución y protegen a las células de los daños asociados al descenso térmico. Estas sustancias pueden penetrar o no la membrana plasmática de las células embrionarias (crioprotectores penetrantes y no penetrantes, respectivamente), y en esta metodología se utilizan en concentraciones que no superan 2 Molar (M). Los agentes penetrantes pueden reemplazar el agua intracelular antes del enfriamiento, lo cual en combinación con una tasa de descenso térmico lenta y controlada, reducirían los cambios de volumen celular y minimizarían la cristalización intracelular (61). Los crioprotectores no penetrantes ejercen su acción a través de un aumento en la osmolaridad de las soluciones de criopreservación, promoviendo la deshidratación celular y disminuyendo entonces la formación y el tamaño de los cristales de hielo (50). En los últimos años, se ha intentado eliminar las macromoléculas de origen animal de las soluciones de criopreservación, reemplazándolas por alcohol polivinílico o hialuronato de sodio (23, 75, 76) con el fin de prevenir problemas sanitarios y favorecer el comercio de embriones así conservados (52).

. Sin embargo, los resultados no han sido muy alentadores por lo cual es necesario seguir investigando el impacto de estos elementos sobre la sobrevida poscriopreservación.

***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 como en el método Cine-Step (42) (descrito más adelante), separada por burbujas de aire. En general, las pajuelas un vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico (Figura 1).

Figura 1. Esquema de una pajuela plástica para cargar embriones



***Enfriamiento inicial.** Se efectúa mediante la introducción de los embriones envasados en la criocámara de una máquina congeladora programable. Así, la muestra se enfría desde la temperatura de equilibrio hasta alrededor de -7°C

***Inducción de la cristalización o "seeding".** 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 N_2 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.

***Descenso térmico lento y controlado.** El descenso térmico se efectúa utilizando máquinas congeladoras programables, desde la temperatura en la cual se induce el "seeding" hasta -30 a -40°C según lo descrito por Willadsen (93), y a tasas comprendidas entre $-0,3$ y $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. De este modo se logra una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización intracelular (40).

***Descenso térmico rápido.** Alcanzada la temperatura de -30 a -40°C las pajuelas se introducen directamente en N_2 líquido. De este modo se alcanza, junto con el descenso térmico lento, una formación controlada de cristales de hielo en la solución de congelación, determinando finalmente la vitrificación del embrión y del medio que inmediatamente lo rodea (26, 69, 72).

***Almacenamiento en N_2 líquido.** Se efectúa en contenedores (termos) de N_2 líquido a -196°C .

***Descongelación.** Este procedimiento debe efectuarse de manera rápida para impedir el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación (40). Rall y Polge (71), indicaron que un descongelamiento lento otorga el tiempo suficiente como para permitir la desvitrificación extra e intracitoplásmica lo que puede conducir a una baja sobrevida poscriopreservación. Para la descongelación, las pajuelas son retiradas del N_2 líquido e introducidas en un baño María a 30°C aproximadamente.

***Extracción de los crioprotectores.** Luego de la congelación-descongelación, la mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones antes de ser transferidos a hembras receptoras o colocados en cultivo. Esto debe efectuarse porque si al momento de la descongelación, las células cargadas de crioprotectores son expuestas, por ejemplo, a una solución de PBS isosmolar respecto de las células en condiciones normales o al tracto reproductor femenino, debido a que el agua difunde más rápido que estos compuestos a través de la membrana plasmática, las células se desintegrarían por el shock osmótico. Por este motivo, se recurre a la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crioprotector utilizado. Otra alternativa es emplear sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante. En 1984, Leibo (42) desarrolló el método One-Step en el cual la extracción del crioprotector (Glicerol 1,5 M) se efectúa dentro de la misma pajuela de transferencia. En esta se carga una columna de sacarosa iso-osmolar al medio de congelación y luego de la descongelación, la pajuela se agita para que se mezclen las soluciones, se mantiene la misma durante 5-20 minutos a $20-37^{\circ}\text{C}$, y se efectúa la transferencia. Una variante a este sistema fue la desarrollada por Massip y Van der Zwahlen (48) quienes obtuvieron buenos resultados cuando los embriones fueron equilibrados y congelados en una mezcla de glicerol (Gl) 1,36 M + sacarosa 0,25 M en PBS y una vez descongelados fueron transferidos directamente a las hembras receptoras sin necesidad de remover los crioprotectores. Posteriormente Voelkel y Hu (90), obtuvieron resultados similares reemplazando el Gl por el etilenglicol (EG) (crioprotector penetrante de muy bajo peso molecular que difunde a través de la membrana plasmática rápidamente). En esta metodología la remoción del crioprotector se efectúa en el ambiente uterino, posibilitando la transferencia directa de los embriones luego de ser descongelados sin necesidad de efectuar ningún otro procedimiento.

4. VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES

Las características generales de la vitrificación de embriones son las siguientes:

*Descenso ultrarápido de la temperatura.

*Utilización de crioprotectores en altas concentraciones.

*Muestra vehiculizada en un pequeño volumen de solución, lo cual posibilita aumentar la tasa de descenso térmico y/o disminuir la concentración de crioprotectores.

Los pasos generales en la vitrificación-calentamiento de embriones pueden resumirse de la siguiente manera:

***Exposición de los embriones a las soluciones de vitrificación.** Las soluciones de vitrificación están formuladas con una combinación de crioprotectores (penetrantes y no penetrantes), un soporte líquido (PBS o medios más enriquecidos como el Tissue Culture Medium [TCM] 199), y macromoléculas (suero, BSA, etc.). Estas soluciones se caracterizan por contener altas concentraciones de agentes crioprotectores (5 a 7 M) (45, 69, 81). Al igual que en las soluciones de congelación, en los últimos años también se ha puesto énfasis en evitar la utilización de suero en la formulación final de las soluciones de vitrificación. De este modo, se han obtenido resultados interesantes utilizando BSA (10) o alcohol polivinílico (43, 57, 92). Con este propósito, también se han utilizado exitosamente ciertas proteínas anticongelantes de peces en las soluciones de vitrificación en embriones bovinos y ovinos (5), así como de origen vegetal (62, 63). Aunque estos resultados han sido prometedores, los mismos aparecen como contradictorios y serán necesarias más investigaciones en este sentido.

***Envasado de los embriones en recipientes apropiados y en pequeños volúmenes.** En la mayoría de los trabajos publicados se han utilizado con éxito las pajuelas de 0,25 ml de capacidad. Sin embargo, en búsqueda de la conservación de ovocitos y embriones en pequeños volúmenes, se han utilizado exitosamente grillas de microscopía electrónica (47), pajuelas de 0,25 ml abiertas y estiradas (Open Pulled Straw OPS), Vajta y col. (86) espirales de nylon (cryoloops) (35, 36, 59) y capilares de vidrio (12, 33). También se ha descrito la vitrificación de ovocitos (64) y embriones (53) descargando estas estructuras suspendidas en una gota de solución de vitrificación directamente en N₂ líquido, sin usar ninguno de los elementos de contención descritos anteriormente.

***Descenso ultrarápido de la temperatura (vitrificación).** Este procedimiento puede llevarse a cabo, dependiendo del protocolo adoptado, en un solo paso introduciendo el soporte del embrión directamente en N₂ líquido, o en dos pasos, enfriándolo previamente durante un corto tiempo en los vapores del mismo. La introducción de las pajuelas de 0,25 ml conteniendo soluciones de vitrificación en N₂ líquido permite alcanzar tasas de descenso térmico del orden de los 2.500°C/minuto (61), mientras que Vajta y col. (82) con OPS determinaron tasas de 22.500°C/minuto entre -25 y -175°C y de 16.700°C/minuto entre 0 y -195°C. Arav (5) diseñó un dispositivo (VIT MASTER, IMT, Israel) mediante el cual la temperatura del N₂ líquido es reducida hasta -210°C aplicando presión negativa. Esto permite aumentar la tasa de descenso térmico principalmente en la parte inicial del enfriamiento (desde 20 hasta -10°C) siendo, seis, cuatro o dos veces mayor que utilizando pajuelas de 0,25 ml, OPS o grillas de microscopía electrónica, respectivamente. Por debajo de -10°C, la tasa de descenso térmico se duplica independientemente del soporte utilizado para conservar los embriones (7).

***Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológicas.** El agua vitrificada mantiene la misma distribución iónica y molecular que en estado líquido, por lo cual, si al calentar la muestra el movimiento molecular no se recupera rápidamente, existe el riesgo que se establezcan los procesos de nucleación homogénea o heterogénea, así como de crecimiento a partir de pequeños núcleos formados durante la vitrificación (95). Por este motivo, durante el calentamiento, se necesita alcanzar altas tasas de ascenso térmico. Rall y Fahy (69) observaron que los mayores porcentajes de sobrevida embrionaria se obtuvieron cuando el calentamiento se efectuó de modo rápido (2.500°C/minuto). En la práctica, estas tasas se logran introduciendo la pajuela en un baño María a 20°C (22, 30, 50, 51, 74, 88) o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39°C durante pocos segundos (26, 43, 55, 73).

***Extracción de los crioprotectores.** Una vez calentadas las pajuelas, los crioprotectores penetrantes deben ser retirados de los embriones, e inmediatamente, éstos deben rehidratarse. Por ello, se debe utilizar un buffer osmótico, en una concentración suficiente para alcanzar una osmolaridad ligeramente inferior a la de la solución de vitrificación. Este buffer (sacarosa), puede o no estar contenido en la misma pajuela. Massip y col. (49) utilizaron una pajuela con una de las columnas de medio con sacarosa 1 M. Al descargar el contenido de la pajuela en una placa, la sacarosa previno el rápido influjo de agua al embrión y la muerte celular. A diferencia de esto, Kuwayama y col. (35) propusieron descargar el contenido de las pajuelas en un placa con una solución de TCM 199 + 1 M de sacarosa a 15°C, ya que las mismas no contenían ninguna columna con sacarosa. En ambos experimentos, se obtuvieron aceptables tasas de sobrevida embrionaria.

Vajta y col. (83, 84, 86) perfeccionaron un sistema parecido al One Step denominado "dilución en pajuela", en el cual una vez calentados, los embriones son mezclados con el medio de dilución (extracción del crioprotector) dentro de la pajuela y mantenidos en ella hasta 30 minutos. Saha y col. (73) utilizaron una solución de vitrificación compuesta por 40% EG, 11,3% trehalosa y 20% polivinilpirrolidona y obtuvieron un 60% de parición transfiriendo directamente el contenido de las pajuelas en receptoras sin remover los crioprotectores en ningún momento.

En la metodología OPS (82), las pajuelas se retiran del N₂ líquido e inmediatamente, el extremo que contiene los embriones, se introduce dentro de una solución compuesta por 0,25 M de sacarosa + 20 % de suero en TCM 199 durante 3 minutos. Trascorrido este tiempo, los embriones son colocados en una solución con 0,15 M de sa-

carosa durante 1 minuto. Todos los pasos descriptos se efectúan sobre platina térmica a 37°C. Una variante a esta metodología fue introducida un año más tarde por Vajta y col. (87), en la cual el extremo delgado de las pajuelas es introducido en una pajuela de 0,5 ml que contiene una solución con 0,2 M de sacarosa. Con este sistema, el calentamiento y la dilución en la pajuela posibilitaría la transferencia de los embriones sin necesidad de trabajar bajo lupa.

5. SOBREVIDA EMBRIONARIA POSCRIOPRESERVACIÓN EVALUADA IN VITRO

La sobrevida embrionaria poscriopreservación puede ser evaluada in vivo mediante su transferencia a hembras receptoras previamente sincronizadas, o mediante su cultivo in vitro. Dentro de esta última metodología se pueden tener en cuenta variables tales como la reexpansión del blastocele y/o la protrusión (eclosión) fuera de la zona pelúcida, la fijación a una monocapa de células en cocultivo (13), las alteraciones celulares (muerte celular o lesiones de membrana), el número de células embrionarias totales (26, 46), la morfología y el metabolismo (24, 43), entre otras.

En las Tablas 1 y 2 se detallan algunos resultados de sobrevida evaluada in vitro de embriones bovinos congelados-descongelados y vitrificados-calentados, respectivamente.

Tabla 1. Sobrevida (protrusión fuera de la zona pelúcida) de Blastocistos/Blastocistos expandidos bovinos producidos in vitro u obtenidos in vivo, congelados-descongelados, evaluada mediante cultivo in vitro, informada por diversos autores.

Autor	Origen	Concentración y tipo de crioprotector	Sobrevida (%)
Trounson y col., 1978	In vivo	Dimetilsulfóxido (DMSO) 1,5 M	25-50
Lehn-Jensen y col., 1981	In vivo	Glicerol (G) 1,4 M	60-67
Leibo, 1984	In vivo	G 1,5 M	36-67
Voelkel y Hu, 1992a	In vivo	Etilenglicol (EG) 1,5 M	70
Hochi y col., 1996	In vitro	EG 1,5 M	96,3
Pugh y col., 1998	In vitro	EG 1,5 M	60,9
Sommerfield y Niemann, 1999	In vitro	EG 1,8 M	30
Khurana y Niemann, 2000	In vitro	G 10%	36
	In vivo	G 10%	80
Kaidi y col., 2001	In vitro	GI 1,36 + sacarosa 0,25 M	70-75
Abe y col., 2002	In vitro	EG 1,8 M	50-74,7

Tabla 2. Sobrevida (reexpansión del blastocele y protrusión fuera de la zona pelúcida) de Blastocistos y Blastocistos expandidos bovinos producidos in vitro u obtenidos in vivo, vitrificados-calentados evaluada mediante cultivo in vitro, según diversos autores.

Autor	Origen	Conc. y tipo de crioprotector +	Sobrevida (%)
Kuwayama y col., 1992	In vitro	Glicerol (G) 22,5% + 1,2-Propanodiol 22,5%	56-100 ^a
Ishimori y col., 1993	In vivo	Etilenglicol (EG) 25% + DMSO 25%	20-85 ^a
Tachikawa y col., 1993	In vitro	EG 40% + Ficoll 30% + Sacarosa 0,5 M	0-73 ^b
		GI 40% + Ficoll 30% + Sacarosa 0,5 M	17-81 ^b
		Propilenglicol 40% + Ficoll 30% + Sacarosa 0,5 M	0-24 ^b
Mahmoudzadeh y col., 1995	In vitro	EG 40% + Ficoll 18% + Sacarosa 10,26%	68 ^a ; 57 ^b
Vajta y col., 1996	In vitro	EG 25% + DMSO 25%	84 ^a ; 69 ^b
Dinnys y col., 1996	In vitro	GI 6,5 M	78 ^a ; 53 ^b
Vajta y col., 1998 ^a	In vitro	EG 16,5% + DMSO 16,5% + Sacarosa 0,5 M	94 ^b
Kaidi y col., 1999	In vitro	EG 25% + GI 25%	53 ^b
Vajta y col., 1999 ^a	In vitro	EG 20% + DMSO 20%	72 ^b
Lazar y col., 2000	In vitro	EG 16,5% + DMSO 16,5% + Sacarosa 0,5 M	46 ^b
Pugh y col., 2000	In vitro	EG 25% + DMSO 25%	70 ^b
Kaidi y col., 2001	In vitro	EG 25% + GI 25%	80 ^a ; 50-55 ^b
Martinez y col., 2002	In vitro	EG 25% + GI 25% + Sacarosa 0,5 M	64 ^a ; 45 ^b
Walker y Seidel, 2005	In vitro	EG 40% + Galactosa 0,5 M + 18% Ficoll	40-91 ^a

^a Sobrevida evaluada como reexpansión del blastocele dentro de las primeras 48 hs de cultivo in vitro poscalentamiento.
^b Sobrevida evaluada como protrusión embrionaria poscalentamiento en cultivo in vitro.

6. EFECTO DEL DESCENSO TÉRMICO SOBRE LAS ESTRUCTURAS CELULARES. CRIOINJURIAS

En la actualidad ningún protocolo de congelación o vitrificación disponible garantiza la total integridad de las estructuras así preservadas. Según Dobrinsky (14), 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:

***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 (29).

Acker y McGann (2) concluyeron que la propagación de cristales de hielo entre células adyacentes se establece mediante un proceso denominado "nucleación catalizada por superficie". Esto contrasta con la teoría de Berger y Uhrík (9) e Irimia y Karisson (20), quienes sostienen que el hielo intracelular se propaga a través de uniones intercelulares tipo gap. Sin embargo, otros autores sostienen que durante la criopreservación se generarían fuerzas suficientes como para producir pequeñas lesiones en la membrana plasmática por donde se propagaría el hielo (56).

Actualmente, la utilización de modernas máquinas congeladoras programables y la combinación de distintos crioprotectores, determinan que sea poco habitual la lesión embrionaria por hielo extracelular. Con el fin de caracterizar la apariencia morfológica de los embriones afectados por este tipo de injuria, Kasai y col. (29) lograron reproducir este proceso colocando embriones de ratón a -3°C y descendiendo la temperatura a $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta -15°C , en ausencia de crioprotector. Cuando los embriones fueron colocados en PBS, observaron deformación de la zona pelúcida y un marcado aumento del tamaño de las células embrionarias.

***Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico.** La adición o extracción de las sustancias crioprotectoras, así como el propio proceso de congelación (efecto de solución), producen cambios de volumen en las células embrionarias que, dependiendo de su magnitud, pueden afectar su sobrevivencia poscriopreservación. La disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua puede determinar modificaciones en la composición del medio intracitoplásmico (27). En este caso, los solutos altamente concentrados podrían precipitar o afectar la conformación proteica y consecuentemente su función metabólica. Por otro lado, la deshidratación favorecería la pérdida de ubicación normal de las estructuras citoplásmicas, aproximándose lo suficiente como para permitir reacciones intermoleculares como uniones entre grupos sulfidrilos libres de tipo irreversible.

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

***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 (14). Sin embargo, los elementos que lo constituyen presentan un comportamiento inestable, en donde las subunidades que lo componen se encuentran en constante recambio (10). Aunque los crioprotectores son necesarios para minimizar los daños que puedan ocurrir durante la criopreservación, según Dobrinsky (14) estos compuestos pueden también tener efectos nocivos sobre los embriones por toxicidad química. Este autor sostiene que el daño se produciría por una alteración en la organización de los filamentos que componen el citoesqueleto, que culminaría con una despolimerización de los mismos.

Otras alteraciones asociadas con la adición de sustancias crioprotectoras son el aumento del espacio perivitelino, el aumento de tamaño mitocondrial y la presencia de vacuolas dentro de las mismas, así como la aparición de signos de degeneración nuclear (15). Además, el glicerol podría inhibir el sistema $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$, el cual es fundamental para el mantenimiento del gradiente osmótico celular (8).

***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 (16, 27, 94). 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 (94), aunque este proceso también puede producirse por efecto directo del frío (66). En este estado, formado por pequeños cilindros

de agua rodeados por fosfolípidos, las membranas celulares pierden la capacidad para llevar a cabo la mayoría de sus funciones. Otra causa por la cual las membranas pueden ser dañadas la constituye la formación de hielo intracelular (3).

***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 (39), lo cual generaría cambios irregulares de volumen en los medios de criopreservación durante un rápido cambio de fase (70). Según Kasai y col. (30) durante la congelación convencional más del 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si las tasas de descenso-ascenso térmico durante la congelación-descongelación no son adecuadamente ajustadas. La utilización de elementos flexibles (pajuelas plásticas) para contener los embriones durante la criopreservación permite amortiguar los cambios de volumen de la solución. Durante la vitrificación-calentamiento, al no producirse cambios de fase, la incidencia de este tipo de crioinjuria es menor (28). 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).

***Otras crioinjurias.** Si bien los mecanismos descritos están bien documentados, estos podrían no ser los únicos por los cuales se produciría daño celular. Morris (54) menciona que durante la congelación, los embriones rara vez toman contacto directo con los cristales de hielo, permaneciendo en la fracción no congelada, donde son expuestos a diversos tipos de estrés físico, tales como:

*Daño mecánico como consecuencia de la formación de burbujas debido a un aumento de gas soluble.

*Alteración en los procesos de difusión y osmosis, producto de un aumento de la viscosidad.

*Desnaturalización proteica, debido a cambios de pH.

En la Tabla 3 se señala el impacto de las diferentes crioinjurias sobre las estructuras preservadas en función del sistema de criopreservación utilizado.

Tabla 3. Frecuencia de desarrollo de las principales crioinjurias asociadas a la congelación convencional o a la vitrificación.

Crioinjuria	Congelación convencional	Vitrificación
Formación de hielo intra/extracelular	+++	-
Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico	+	++
Efecto tóxico del crioprotector.	+	+++
Alteraciones de la membrana plasmática.	+	+
Fractura embrionaria o de la zona pelúcida.	++	+

+++ muy frecuente; ++ frecuente; + poco frecuente; - ausente.

7. RESPUESTA CELULAR ANTE LAS CRIOINJURIAS

La criopreservación representa un desafío para las estructuras biológicas, lo cual puede generar distintos tipos de respuesta celular, ya sea a nivel estructural, ultraestructural o metabólico, determinando en muchos casos la muerte celular.

***Cambios estructurales y ultraestructurales relacionados con la criopreservación.** Hyttel, Lehn-Jensen y Greve (19) demostraron que la criopreservación estaba asociada con alteraciones morfológicas. Estos autores pudieron observar daños en la zona pelúcida, irregularidades en el ordenamiento espacial de las células embrionarias, restos celulares en el espacio perivitelino y defectos a nivel citoplásmico que daban el aspecto de espacios vacíos.

Según Fair y col. (15), los blastocistos bovinos obtenidos in vivo se caracterizan ultraestructuralmente por presentar un espacio perivitelino estrecho, células trofoectodérmicas con gran cantidad de microvellosidades orientadas hacia la zona pelúcida, gotas lipídicas pequeñas, sistemas de unión celular bien definidos y una gran cantidad de mitocondrias redondeadas o alargadas con numerosas crestas transversales. Estos autores observaron que luego de la congelación-descongelación, los embriones presentaron un agrandamiento del espacio perivitelino, disminución del tamaño celular, daños en las microvellosidades y presencia de detritus celulares y gotas lipídicas en el espacio perivitelino. En cambio, en los embriones bovinos producidos in vitro, observaron una mayor cantidad de gotas lipídicas, microvellosidades más esparcidas, mitocondrias de aspecto redondeado con crestas transversales o periféricas, o alargadas con crestas transversales, presencia de núcleos con signos de degeneración, detritus celulares en el espacio perivitelino e inclusive en el blastocele. Poscriopreservación, la mayoría de estos embriones perdieron su aspecto circular, fue imposible distinguir morfológicamente las células trofoblásticas de las pertenecientes a la masa celular interna así como las uniones celulares y las organelas, y fue posible observar gotas lipídicas y severas alteraciones en la membrana plasmática. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ohboshi y col. (60), quienes pudieron observar pérdida de microvellosidades, ruptura de la membrana plasmática y aumento del volumen mitocondrial y del retículo endoplásmico, siendo estos cambios

más pronunciados en los embriones que habían sido equilibrados con los crioprotectores en un solo paso. Estos autores concluyeron que la criopreservación mediante vitrificación genera daños sobre las membranas celulares de los embriones bovinos, y que la naturaleza y la magnitud de los mismos dependen del tipo de protocolo utilizado.

Desde el punto de vista de la estructura del embrión, se ha observado que el recuento de células totales es menor luego de los procesos de congelación-descongelación y vitrificación-calentamiento, junto a la aparición de detritus celulares en el espacio perivitelino (25). Estos últimos, probablemente representen restos de células que colapsan durante los procesos de criopreservación mencionados.

***Cambios metabólicos asociados a la criopreservación.** Se han informado cambios importantes en embriones criopreservados producidos tanto in vitro como in vivo, observándose por lo general, una disminución en el consumo y utilización de los nutrientes. Luego de la congelación-descongelación, los embriones producidos in vitro reducen un 50% la producción de CO₂ a partir de glucosa y ésta disminución es particularmente marcada en los embriones de inferior calidad (32).

En los embriones producidos in vivo, no se encontraron diferencias, excepto en aquellos de baja calidad (17, 32).

De acuerdo con los hallazgos de Kaidi y col. (24), quienes compararon la morfología y el metabolismo de blastocistos bovinos producidos in vitro, luego de ser congelados o vitrificados, el consumo de glucosa, piruvato y oxígeno disminuyó en los embriones sometidos a congelación pero no en los vitrificados. Esto coincide con los resultados de Partridge y col. (65) y Gardner y col. (17) quienes encontraron un menor consumo de glucosa en embriones que sobrevivieron a la congelación. Según Uechi y col. (80) esto se debería a una disminución, por efecto de la congelación, en la expresión del transportador de glucosa transmembrana GLUT 1. Kaidi y col.(24) compararon el consumo de glucosa, piruvato y oxígeno entre embriones congelados y sin criopreservar y encontraron que en los primeros, este fue menor en todos los casos. Sin embargo, cuando el consumo de nutrientes fue expresado por célula embrionaria sobreviviente, no hallaron diferencias.

Otro cambio metabólico asociado con la criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro lo constituye la disminución en la síntesis de ADN, independientemente del crioprotector utilizado (78).

De acuerdo a lo descripto, los cambios metabólicos asociados a la criopreservación probablemente se relacionen con alteraciones ultraestructurales como las mencionadas previamente, lo cual modificaría las vías fisiológicas de metabolización de nutrientes pudiendo evidenciarse a través de una disminución en su consumo.

8. CONCLUSIÓN

En la actualidad, la congelación convencional constituye la única metodología utilizable en programas de criopreservación de rutina, principalmente en aquellos que involucran la conservación de embriones producidos in vivo. Esto podría deberse a que la misma ofrece resultados aceptables y repetibles en gestación y nacimientos, observándose sólo una diferencia del orden del 10% entre los transferidos en fresco y los criopreservados. Con respecto a la vitrificación, puede concluirse que existe una gran diversidad de protocolos y también una alta variabilidad en sus resultados. Al mismo tiempo, en esta metodología, la mayor cantidad de la información disponible se ha generado a partir de la transferencia de embriones producidos in vitro, en los cuales las condiciones de cultivo pueden influir en los resultados obtenidos. En este tipo de embriones la técnica ha mostrado adaptarse de un modo muy promisorio teniendo en cuenta los resultados informados respecto a la congelación convencional. Sin embargo, la relativa complejidad de los protocolos disponibles, la falta de un sistema de transferencia directa probado, y la escasez de resultados provenientes de transferencia de embriones producidos in vivo, entre otros, limitan la difusión de la vitrificación como sistema confiable de criopreservación de embriones bovinos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, H.; Yamashita, S.; Satoh, T ; Hoshi, H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free o serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* 61:57-66.
2. Acker, J. P; McGann, L. E. 1998. The role of cell-cell contact on intracellular ice formation. *Cryo-letters* 19:367-374.
3. Acker, J. P; McGann, L. E. 2001. Membrane damage occurs during the formation of intracellular ice. *Cryo-letters* 22:241-254.
4. Akyurt, M. Zaki, G. Habeebullah, B. 2002. Freezing phenomena in ice water systems. *Energy Conversion and Management* 43:1771-1789.
5. Arav, A.; Rubinsky, B.; Seren, E.; Roche, J.E; Boland, M.P. 1994. The role of thermal hysteresis proteins during cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 41:107-112.
6. Arav, A. 1998. Method for cryopreservation of biological samples. US Patent 5,715,686.
7. Arav, A.; Yavin, S.; Zeron, Y.; Natan, D., Dekel, L; Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187:77-81.
8. Barnet, R. E. 1978. The effect of dimethylsulfoxide and glycerol on Na⁺ K⁺ ATPase y la estructura de la membrana. *Cryobiology* 15:227-229.

9. Berger, W K.; Uhrik, B. 1996. Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to-cell propagation of intracellular ice in cell chains from salivary glands. *Experientia* 52:843-850.
10. Bretscher, a. 2000. The cytoskeleton: from regulation to function. *European Molecular Biology Organization*, 61:473-476.
11. Chiewe, M. C.; Rall, W E; Stuart, L. D.; Wildr, D. E. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology* 36:279-293.
12. Cho, S. K.; Cho, S. G., Bae, I. H., Park, C. S.; Kong, I. K. 2002. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim. Reprod. Sci.* 73:151-158.
13. Dinnyes, A.; Carolan, C.; Lonergan, P; Massip, A.; Mermillod, P 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology* 46: 1425-1439.
14. Dobrinsky, J.R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryo. *Theriogenology* 45:17-26.
15. Fair, T; Lonergan, P; Dinnyes, A.; Cottell, D. C.; Hyttel, P; Ward, EA. 2001. Ultrastructural of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocysts production. *Mol. Reprod. Dev.* 58:186-195.
16. Gardner, D. K. 1999. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *J. Reprod. Fert., Supp.* 54:461-475.
17. Gardner, D. k.; Pawelczynski, M.; Trounson, A. O. 1996. Nutrient uptake and utilization can be used for select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 44:472-475.
18. Hoshi, S. Semple, E. Leibo, S. P 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 46:837-843.
19. Hyttel, P; Lehn-Jensen, H.; Greve, T. 1986. Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by two-step freezing method. *Acta anat.* 125:27-31.
20. Irimia, D.; Karisson, J. O. M. 2002. Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct. *Biophysical Journal* 162:1858-1868.
21. Ishimori, H.; Miki, Y.; Kishi, M.; Saeki, K.; Seike, N.; Kainuma, H. 1993. Vitrification of bovine embryos. *Theriogenology* 40:427-433.
22. Ishimori, H.; Saeki, K.; Inai, M.; Nagao, Y.; Itasaka, J.; Miki, Y.; Seike, N.; Kainuma, H. 1992. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 37:228.
23. Joly, Th.; Nibart, M.; Thibier, M. 1992. Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the Jeep freezing of embryos from mice and sheep: an in vitro investigation. *Theriogenology* 37:473-480.
24. Kaidi, S.; Bernard, P; Lambert, P; Massip, E; Dessy, E; Donnay, I. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biol. Reprod.* 65:1127-1134.
25. Kaidi, S.; E; Donnay, I; Dessy, E; Massip, A. 2000. Effect of freezing or vitrification on the quality of in vitro produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 53:257.
26. KAIDI, S.; VAN IANGNEDONCKT, A.; MASSIP, E; DESSY, E; DONNAY. 1999. Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for vitrification of in vitro bovine embryos. *Theriogenology* 52:515-252.
27. Karow, A. M. 2001. *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists*. En: www.xytext.com.
28. Kasay, M. 1996. Simple and efficient method for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 42:67-75.
29. Kasay, M.; Ito, K.; Edashige, K. 2002. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum. Reprod. Vol. 17, N°- 7:1863-1874.*
30. Kasail, M.; Komi, J. H.; Takakamo, A.; Tsudera, H.; Sakurai, T; Machida. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89:91-97.
31. Kasai, M.; Zhu; S. E.; Pedro, K.; Nakamura, K.; Sukurai, T; Edashige, K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology* 33:459-464.
32. Khurana, N. K.; Niemann, H. 2000a. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* 54:313-326.
33. Kong, I. K.; Lee, S. L; Cho, S. G.; Cho, S. K.; Park, C. S. 1999. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology* 53:1817-1826.
34. Kuleshova, L.; L. Lopata, A. 2002. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility* 78:449-459.
35. Kuwayama, M.; Hamano, S.; Nagai, T 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 96:187-193.
36. Lane, M.; Forest, E. A.; Lyons, E. A.; Bavister, B. D. 1999a. Live birth following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology* 51:167.
37. Lane, M.; Schoolcraft, W B.; Gardner, D. K.; Phil, D. 1999b. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility* 72:1073-1078.
38. Lazar, L.; Spak, J.; David, V 2000. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology* 54:571-578.
39. Lehn-tensen, H.; Greve, T; Navas, A. P 1981. Two-step freezing of cow embryos in 1,4 M glycerol. *Theriogenology* 15:49-54.
40. Lehn-tensen, H.; Rall, W E 1983. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology* 19:263-277.
41. Leibo, P; Loskutoff, N. M. 1993. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:81-94.
42. Leibo, S.P. 1984. A one-step method for direct non surgical transfer of frozen bovine embryos. *Theriogenology* 21:767-790.

43. Leoni, G.; Bogliolo, L.; Berlinguer, E.; Rosati, L.; Pintus, P. P.; Ledda, S.; Naitana, S. 2002. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. *Cryobiology* 45:204-212.
44. Lindner, G. M.; Wright, R. W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
45. Mahmoudzadeh, A. R.; Van Soom, A.; Bols, P.; Ysebaert, M. T.; De Kruif, A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J. Reprod. Fert.* 103:33-39.
46. Martínez, A. G.; Valcarcel, A.; De Las Heras, M. A.; De Matos, D. G.; Furnus, C.; Brogliatti, G. 2002. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Anim. Reprod. Sci.* 73:11-21.
47. Martino, A.; Songsasen, N.; Leibo, S. P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54:1059-1069.
48. Massip, A.; Van Der Zwalmen, P. 1984. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet. Rec.* 115:327-328.
49. Massip, A.; Van Der Zwalmen, P.; Ectors, E. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27:69-79.
50. Massip, A.; Van Der Zwalmen, P.; Scheffen, B.; Ectors, E. 1987. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.* 19:117-129.
51. Massip, A.; Van der Zwalmen, P.; Scheffen, B.; Ectors, E. 1989. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.* 19:117-129.
52. Massip, A.; 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.* 36:49-55.
53. Misumi, K.; Suzuhi, M.; Sato, S.; Saito, N. 2003. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* (article in press).
54. Morris, J. 2000. Asymptote cool guide of cryopreservation. En: <http://www.asymptote.ca.uk>
55. Mtango, N. R.; Varisanga, M. D.; Dong, Y. J.; Otoi, T.; Suzuki, T. 2001. The effect of prefreezing the diluent portion of the straw in a step-wise vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts. *Cryobiology* 42:135-138.
56. Muldrew, K.; McGann, I. E. 1994. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal* 66:532-541.
57. Naitana, S.; Ledda, S.; Loi, P.; Leoni, G.; Bogliolo, L.; Dattena, M.; Cappai, P. 1997. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim. Reprod. Sci.* 48:247-256.
58. Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-125.
59. Oberstein, N. N.; O'Donovan, M. K.; Bruemer, J. E.; Seidel, Jr., G. E.; Carnevale, E. M.; Squires, E. L. 2000. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 55:607-613.
60. Ohboshi, S.; Fujihara, N.; Yoshida, T.; Tomangane, H. 1998. Ultrastructure of bovine in vitro-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. *Zygote* 6:17-26.
61. Palasz, A. T.; Mapletoft, R. J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances* 14:127-149.
62. Palasz, A. T.; Del Campo, M. R.; Mapletoft, R. J. 1997. The effect of macromolecules in an ethylene glycol/sucrose medium for the vitrification of in vivo-derived bovine blastocysts. *Theriogenology* 45:167.
63. Palasz, A. T.; Gustafsson, H.; Rodriguez-Martínez, H.; Gustaf, G.; Larson, B.; Mapletoft, R. J. 1997. Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology* 47:865-879.
64. Papis, K.; Shizumi, M.; Izaike, Y. 1997. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 54:651-658.
65. Partridge, R. J.; Wrathall, A. E.; Leese, H. J. 1995. Glucose uptake and lactate production by single frozen-thawed bovine embryos produced in vivo or by in vitro fertilisation. *J. Reprod. Fert.* 13:41.
66. Petit, V. A.; Edidin, M. 1974. Lateral phase separation of lipids in plasma membranes: effect of temperature on mobility of membrane antigens. *Science* 184:1183-1185.
67. Pollard, J. W.; Leibo, P. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41: 107-112.
68. Pugh, P. A.; Trevit, H. R.; Niemann, H. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 58:9-22.
69. Rall, W. E.; Fahy, G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
70. Rall, W. E.; Meyer, T. K. 1989. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 31:689-692.
71. Rall, W. E.; Polge, C. 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J. Reprod. Fert.* 70:285-292.
72. Rall, W.; Reid, D. S.; Polge, C. 1984. Analysis of slowwarming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology* 21:106-121.
73. Saha, S.; Otoi, T.; Takagi, M.; Boediono, A.; Sumantri, C.; Suzuki, T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33:291-299.

74. Saito, N.; Imai, K.; Tomizawa, M. 1994. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 41:1053-1060.
75. Seidel, G. E.; Elsdén, R. P.; Brink, Z. 1990. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemical defined macromolecules. *Theriogenology* 33:322.
76. Sommerfeld, V.; Niemann, H. 1999. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38:95-105.
77. Tachikawa, S.; Otoi, T.; Kondo, S.; Machida, T.; Kasai, M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 34:266-271.
78. Takagi, M.; Sakonju, L.; Suzuki, T. 1996. Effect of cryopreservation on the synthesis of DNA by the inner cell mass of in vitro produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 45:164.
79. Trounson, A. O.; Shea, B. E.; Ollis, G. W.; Jacobson, M. E. 1978. Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 47:677-681.
80. Uechi, H.; Tsutmi, O.; Morita, Y.; Taketani, Y. 1997. Cryopreservation of mouse embryos affects latter embryonic development possibly through reduced expression of the glucose transporter glut 1. *Mol. Reprod. Dev.* 48:496-500.
81. Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:357-364.
82. Vajta, G.; Holm, P.; Kuwayama, M.; Booth, P J.; Jacobsen, H.; Greve, T.; Callesen, H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51:53-58.
83. Vajta, G.; Holm, P.; Torben, G.; Callensen, H. 1996a. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim. Reprod. Sci.* 45:191-200.
84. Vajta, G.; Holm, T.; Greve, H.; Callensen, H. 1995. Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified in vitro produced bovine blastocysts. *Vet. Rec.* 137:372.
85. Vajta, G.; Holm, T.; Greve, T.; Callensen. 1996b. Overall efficiency of in vitro production and vitrification in cattle. *Theriogenology* 45:683-689.
86. Vajta, G.; Rindom, N.; Peura, T.; Holm, P.; Greve, T.; Callensen, H. 1999a. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 52:939-948.
87. Vajta, G.; Murphy, C. N.; Machaty, Z.; Prather, R. S.; Greve, T.; Callensen, H. 1999b. In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open pulled straw method. *Vet. Rec.* 144:181-182.
88. Valdez, C. A.; Abas Manzi, O.; Takahashi, Y.; Hishinuma, M.; Kanagawa, H. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 33:627-632.
89. Vila, L., Carretero, E. 1985. Manejo de congeladores programables. *Biol. Clin. Hematol.* 7:61-67.
90. Voelkel, S. A.; Hu, Y. X. 1992a. The use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37:687-697.
91. Voelkel, S. A.; Hu, Y. X. 1992b. Direct transfer of frozenthawed bovine embryos. *Theriogenology* 37:23-37.
92. Walker, D.; Seidel, G. 2005. Vitrification of bovine embryos without animal-derived products. *Rep.Fert. Dev. Vol. 17* (2):153.
93. Willadsen, C. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. En: *The freezing of mammalian embryos (Ciba Found. Symposium.)* pp. 175-189.
94. Wolfe, J.; Bryant, G. 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* 39:103-129.
95. Wowk, B.; Leidl, E.; Rasch, C. M.; Mesbah-Karimi, N.; Harris, S.; Fahy, G. M. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 40:228-236.
96. Zachariassen, K. E., Kristiansen, E. 2000. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* 41:257-279.

Volver a: [Transferencia embrionaria](#)