

CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO

Carmen Díez Monforte. 2003. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.
Centro de Selección y Reproducción Animal, Gijón, Asturias.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Transplante embrionario](#)

RESUMEN

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

Palabras clave: congelación, conservación, criopreservación, vitrificación, embrión, reproducción

INTRODUCCIÓN

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

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

- ◆ La definición de medios sintéticos cada vez más adaptados a los requerimientos específicos para que el embrión bovino vea satisfechas sus necesidades metabólicas durante las primeras fases de su desarrollo.
- ◆ Los primeros éxitos en la puesta a punto de la técnica de la fecundación *in vitro* (FIV), en un principio a partir de ovocitos madurados *in vivo* y obtenidos por lavado de los oviductos tras el sacrificio del animal, posteriormente con la utilización de ovocitos recuperados a partir de ovarios procedentes de matadero.
- ◆ Por último, el desarrollo de un sistema que permite la obtención de ovocitos a partir de hembras vivas, conocido con el nombre de Ovum Pick-Up (OPU).

La producción de embriones *in vitro* (EPIV) a partir de ovocitos obtenidos de vacas de alto mérito es una herramienta que ofrece nuevas perspectivas para la aceleración del progreso genético. Esta técnica se practica con ritmos de recogida intensivos (2 veces/semana durante 2 meses consecutivos) sobre hembras gestantes o vacías, e independientemente de su normalidad reproductiva. Asimismo, la FIV representa un medio para la producción de embriones a bajo precio a partir de ovarios de matadero. La utilización de las bajas temperaturas para conservar los embriones producidos por esta tecnología se ha convertido en una herramienta indispensable que permitirá consolidar y aumentar el impacto de estas tecnologías.

La criopreservación de los embriones supone el ralentizamiento de su metabolismo hasta un punto próximo a su detención, con el fin de sincronizar acontecimientos posteriores, o de modificar la ciclicidad reproductiva, y es una técnica ampliamente usada como complemento de los procesos de reproducción asistida. En el ámbito del ganado vacuno, y en el marco de la UE, las estadísticas correspondientes al año 1999 muestran que un 58% de los embriones transferidos estaban congelados (*in vivo* e *in vitro*), lo que da idea de la importancia del desarrollo de estas técnicas (1).

La criopreservación y el almacenamiento de embriones a bajas temperaturas (Nitrógeno líquido-NL-) presenta numerosas ventajas, tanto desde el punto de vista biológico como desde el comercial:

- ◆ Permite una reducción de costes derivados de la aplicación de las tecnologías reproductivas.
- ◆ Facilita una disociación de todas estas técnicas de la actividad reproductiva cíclica que presentan las especies mamíferas de interés, consiguiéndose una independencia temporal del estado fisiológico de los animales (hembras receptoras, por ejemplo).
- ◆ Limita la deriva genética.
- ◆ Elimina las patologías que normalmente se asocian al mantenimiento de animales vivos.
- ◆ Posibilita la conservación de razas o especies en riesgo de extinción mediante la creación de bancos de embriones congelados, manteniendo intacto el patrimonio genético.

La criopreservación está influida por un elevado número de variables, de forma que ninguna aproximación que contemple sólo uno o parte de los aspectos implicados garantiza una eficacia total. A pesar de esto, y con independencia del sistema utilizado, los principios básicos persiguen una protección de las células frente a los principales efectos perjudiciales del proceso, a saber, formación de hielo intracelular, deshidratación y efectos tóxicos de los crioprotectores (4, 5, 25, 37).

El primer ternero resultado del trasplante de un embrión *in vitro*, congelado/descongelado nació en 1990 (10). Desde entonces han sido muchos los protocolos de congelación ensayados, pero su eficacia está corrientemente evaluada en términos de supervivencia tras descongelación y cultivo *in vitro*. Sólo unos pocos estudios ofrecen datos de porcentajes de gestación tras transferencia de uno o dos embriones en un número significativo de receptoras. Las tasas de gestación tras transferencia de embriones *in vitro* crioconservados por métodos clásicos de congelación lenta o por vitrificación son muy variables, como se puede ver en la tabla 1.

Dado que hasta la fecha, la mayor parte de los estudios sobre congelación se habían realizado a partir de embriones obtenidos *in vivo*, resultó patente en seguida, que los embriones producidos *in vitro* manifestaban un comportamiento diferente frente al frío, fenómeno que quedó corroborado por multitud de experimentos que se desarrollaron a partir de entonces.

En una experiencia en la que embriones *in vivo* e *in vitro* fueron congelados por un sistema tradicional lento (Glicerol 1,5 M; descenso lento hasta -35°C e introducción en N₂), los resultados mostraron que más de un 80% de los embriones *in vivo* llegó a eclosionar 72 h postdescongelación, mientras que sólo un 20% de los embriones *in vitro* llegó a este estadio (18, 20).

Tabla 1. Eficacia de los métodos de crioconservación de embriones bovinos producidos *in vitro* (12).

	Crioprotector	Dilución	% Gestación
Congelación lenta			
Reichenbach y col., 1991	1,36 M Gly	4 etapas	11,3 (28/248)
Kajihara y col., 1992	10% Gly + 0,2M Sac	1 etapa	38 (327/866)
Massip y col., 1987	1,36 Gly + 0,25M Sac	1 etapa	23 (4/17)
Wurth y col., 1994	1,2M Gly	4 etapas	14 (5/35)
Hasler y col., 1995	1,36M Gly	3 etapas	35 (34/97)
Van Langendonck y col, 1994	10% Gly	1 etapa	59 (20/34)
Vitrificación			
Wurth y col., 1994	6,5M Gly + 6% w/v BSA	2 etapas	24 (20/85)
Agca y col., 1994	10% Gly + 20% EG	1 etapa	50 (8/16)*
Delval y col., 1995	40%EG + 18% Ficoll + 0,3M Sacarosa	1 etapa	66,6 (8/12)*
Van Langendonck y col, 1994	6,5M Gly + 6% w/v BSA	1 etapa	43 (17/40)

* transferencia de 2 embriones/receptora

Esta experiencia permitió demostrar también el efecto del estadio de desarrollo en su sensibilidad al enfriamiento, puesto que ninguna de las mórulas producidas *in vitro* resistió la congelación, mientras que el 64% de los blastocistos lo hizo, fenómeno inverso al producido en el caso de los embriones *in vivo*.

La primera conclusión a la que se llegó tras el análisis de todos estos resultados, fue que los embriones producidos *in vivo* y los EPIV son "de alguna forma" diferentes, y que las diferencias existentes entre ambos podrían explicar su comportamiento ante la crioconservación.

EL EMBRIÓN BOVINO CULTIVADO IN VITRO

Desde el inicio de la aplicación de la tecnología *in vitro*, se han desarrollado numerosos sistemas de cultivo capaces de llevar a buen término la producción de embriones bovinos. Estos sistemas se clasifican en función de su composición, o de la presencia o no de células en el medio de cultivo, como soporte del desarrollo embrionario. Las formulaciones de estos medios derivan de estudios realizados sobre la composición bioquímica de los medios tubárico y uterino, así como del análisis de las necesidades metabólicas del embrión.

Vamos a ver cuáles son las diferencias que caracterizan a los EPIV y algunas de las alteraciones resultantes de las condiciones de cultivo *in vitro*. Algunos de estos parámetros deben ser tenidos en cuenta como indicadores de la capacidad de desarrollo de los embriones tras crioconservación y transferencia. Veremos también que las condiciones de cultivo afectan a las propiedades criobiológicas de las membranas celulares.

MEDIO AMBIENTE

El medio ambiente en el que se desarrolla el embrión *in vitro* difiere sustancialmente del que existe en condiciones *in vivo*. Durante su desarrollo *in vitro* los embriones se ven expuestos a choques térmicos, fuentes luminosas, atmósfera gaseosa (5% de CO₂ en aire) y a unas condiciones de cultivo estáticas caracterizadas por una importante cantidad de medio rodeando al embrión que puede aportar un exceso, o bien carecer de los nutrientes necesarios (23). Estas condiciones de cultivo, que permiten obtener los mejores porcentajes de embriones viables (hasta un 40% de blastocistos en día 7) inducen diferencias fundamentales tanto desde un punto de vista morfoló-

gico como fisiológico que determinan que el comportamiento frente al frío de los EPIV sea diferente al de los embriones obtenidos *in vivo*.

Tabla 2. Comparación de las condiciones de desarrollo *in vivo* e *in vitro* de los embriones bovinos (23).

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

VELOCIDAD DE DESARROLLO Y VALORACIÓN MORFOLÓGICA IN VIVO

El embrión se desarrolla y diferencia en el tiempo según una cronología bien caracterizada en la especie bovina. La fecundación marca el inicio del periodo embrionario caracterizado por una serie de divisiones celulares y la aparición de las primeras diferenciaciones. En los bovinos la primera división de segmentación tiene lugar entre 11 y 20 horas tras la fecundación, alcanzándose el estadio de 8 células entre 56 y 64 h después. A partir de la fase de 16-32 células (80-86 h post-FIV), se establecen contactos entre los blastómeros y se estrechan las uniones entre las membranas plasmáticas de forma que las células no son visibles de forma individual: es el estadio de mórula compacta. Cuando el embrión tiene entre 80 y 100 células (130-144 horas post-FIV) comienza a acumularse líquido en el interior de la mórula, inicialmente en la parte basal de las células externas y después fuera de las células dando lugar a la formación de una cavidad: el blastocele. Este estadio representa el momento del desarrollo en el que se diferencian dos tipos diferentes de células: las células del trofoectodermo, en la superficie del embrión y con naturaleza epitelial (darán origen a las envolturas fetales) y las células de la masa celular interna (MCI), en la parte interior, que darán lugar al feto.

CRONOLOGÍA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

Tabla 3. Cronología del desarrollo embrionario (Cortesía de la Dra. Carbajo Rueda)

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

Un estudio comparado de la cronología del desarrollo embrionario *in vitro* de embriones madurados y fecundados *in vivo* evidenció diferencias morfológicas. Los embriones fecundados *in vivo* tienen, en la fase de una célula, un espacio perivitelino importante; en el estadio de 8 células, los blastómeros son de forma y tamaño regulares; las mórulas se compactan de forma sincrónica y las células de la MCI de los blastocistos están bien definidas. En el caso de EPIV, el espacio perivitelino en fase de 1 célula es muy limitado; en estadio de 8 células los blastómeros son irregulares en su forma y tamaño; la compactación de las mórulas es mucho menos pronunciada (en ocasiones no es apreciable), y las células de los blastocistos aparecen oscuras y difuminadas (11, 14). Es más, los EPIV se dividen más lentamente y de una forma más asincrónica: 72 horas post-FIV, sólo un 27% de los embriones alcanzó el estadio de 8 células contra un 46% para los embriones *in vivo* (12). Por último, los embriones que sufren la segmentación más rápidamente tienen una capacidad de desarrollo superior en términos de formación de mórula-blastocisto, ya que el 35% de los EPIV alcanza este estadio 7 días tras la inseminación, mientras que la cifra se eleva a un 69% para el caso de los embriones *in vivo*.

La viabilidad de los embriones cultivados *in vitro* tras crioconservación está correlacionada con su cinética de desarrollo. Efectivamente, aquellos embriones que sufren su primera segmentación 26 a 36 h postFIV, alcanzan el estado blastocisto más rápidamente que los que se segmentan de forma más tardía (36-48 h). Estos blastocistos

desarrollados tras 6-7 días de cultivo *in vitro* son menos sensibles a la congelación que los que necesitan ser cultivados durante más tiempo para alcanzar dicho estadio (20).

La evaluación del número de células de los embriones bovinos obtenidos *in vivo*, es otro indicador de su viabilidad embrionaria. El número de células de los EPIV es variable en función de los diferentes sistemas de cultivo empleados (15), pero también del sistema de recuento que puede dar lugar a amplios errores (12). Los blastocistos cocultivados con células del cúmulus en medio M199, tienen la mitad de células que los cultivados en un oviducto de coneja como hospedadora intermediaria. Por su parte, los embriones desarrollados en medio condicionado por células de oviducto, tienen un número de células significativamente menor que los embriones desarrollados en sistemas de cocultivo (12).

Las técnicas de coloración diferencial existentes hoy en día permiten evidenciar más diferencias entre los embriones *in vivo* y los EPIV. Aunque embriones en el mismo estadio de desarrollo tengan un número comparable de células totales, la cantidad de células de la MCI es significativamente inferior en el caso de los EPIV (35). La evaluación conjunta del número total de células y del de la MCI es otro buen indicador de la calidad del embrión desarrollado en un sistema de producción determinado.

La frecuencia de aberraciones cromosómicas varía entre un 2-17% en los embriones *in vivo*, para elevarse hasta un 45% en el caso de los EPIV, según el estadio de desarrollo; los factores que favorecen la aparición de estas alteraciones pueden tener un origen intrínseco (edad materna, calidad del ovocito...), pero principalmente tienen un origen extrínseco en el caso de la manipulación *in vitro*. En los bovinos las anomalías cromosómicas serían las responsables de parte de las mortalidades embrionarias precoces observadas en el momento de la implantación entre los días 21 y 35 tras la transferencia de EPIV. De hecho, las tasas de gestación medidas a día 21 por los niveles séricos de proteína específica de gestación, suelen ser más elevadas, para experimentar un descenso después del día 35.

Por último, dentro de este apartado cabe citar el hecho de que la zona pelúcida de los EPIV se comporta de forma diferente en presencia de la enzima pronasa, comparada con los embriones *in vivo*: es más sensible a la acción de la enzima disolviéndose en menos de 2 minutos (más de 3 en el caso de los *in vivo*) (20). No obstante este hecho, parece que la ZP actúa como una barrera más resistente a la eclosión que la ZP de los embriones *in vivo*.

ULTRAESTRUCTURA

La microscopía electrónica permite la observación de diferencias entre los embriones producidos *in vivo* en *in vitro*, en idénticos estadios de desarrollo, y entre EPIV en función del medio de cultivo. Los blastómeros de los EPIV tienen un número más elevado de vacuolas citoplasmáticas y fagosomas. Las uniones "gap" entre células son más cortas y menos numerosas (11). De una forma general, los embriones cultivados *in vitro* tienen un aspecto más oscuro y el citoplasma está sembrado de gran cantidad de inclusiones lipídicas, cuyo número varía en función de las condiciones de cultivo. Estas son muy numerosas cuando se suplementa el medio con suero, y son menos abundantes en el citoplasma de embriones cultivados en medios suplementados únicamente con BSA y aminoácidos (7, 29).

La estructura mitocondrial también difiere entre ambos tipos de embriones. Los EPIV ven reducida de forma significativa la relación volumen mitocondrial/volumen citoplasmático con relación a los embriones *in vivo* (9). Si tenemos en cuenta que este orgánulo es el lugar de la célula donde se asienta la mayor parte de las reacciones oxidativas responsables del suministro de energía y de los procesos de síntesis de ATP acoplados a dichas reacciones, cabe pensar que este hecho diferencial tenga también un reflejo a nivel metabólico.

El metabolismo embrionario ha sido y es objeto de una gran cantidad de estudios, orientados a la elaboración de medios de cultivo que aporten al embrión todos aquellos sustratos necesarios para su adecuado desarrollo y no otros (27, 28); el último fin sería la optimización de las técnicas de cultivo *in vitro*. Otra parte de los estudios está destinada a una profundización en el conocimiento de las diferencias entre ambos tipos de embriones, con el fin de poder responder a interrogantes como la diferente sensibilidad a la crioconservación (30).

Así, Leibo *et al* (18) demostraron que la densidad de los EPIV es menor que la de los *in vivo*, probablemente debido a una mayor tasa de lípidos/proteínas en el primero de los casos. Aunque el papel que puedan desempeñar dichos lípidos no ha sido dilucidado, diversos equipos han demostrado una mejora significativa de la congelabilidad de los blastocistos obtenidos tras el cultivo de cigotos sometidos a delipidación o desplazamiento de dichos lípidos citoplasmáticos (3, 19).

Las microgotas citoplasmáticas de lípidos tienen una fuerte relación espacial con el retículo endoplásmico liso y desempeñan un papel muy importante como fuente de elementos nutritivos, pero también modificando las propiedades físicas y las funciones de las membranas. La presencia de estas microgotas podría tener, por si misma, un efecto directo sobre la supervivencia durante el enfriamiento (12).

Se sabe que el enfriamiento hasta 15°C produce una tendencia a la agregación de las microgotas, para formar gotas intracitoplasmáticas más grandes. Ello podría provocar una pérdida de la organización del citoplasma y una lesión irreversible del embrión.

TÉCNICAS ACTUALES DE CONGELACIÓN DE EMBRIONES IN VITRO

1. CONGELACIÓN TRADICIONAL (MÉTODOS DE EQUILIBRIO)

Los crioprotectores (CP) utilizados en estos métodos son normalmente permeables. Los más frecuentemente utilizados son: glicerol y etilenglicol.

Durante la fase inicial de preenfriamiento, los embriones se exponen a la presencia del crioprotector en una fase que denominamos de equilibración. La respuesta inmediata del embrión ante la presencia de un CP permeable es una rápida disminución de volumen por pérdida del agua intracelular, hasta que se alcanza el equilibrio. Este fenómeno se debe a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular y a que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores; la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del CP. A medida que el CP penetra en el embrión, éste se expande gradualmente a causa de una reentrada de agua para el mantenimiento del equilibrio osmótico (26). El momento en que se produce esta reexpansión refleja:

- ◆ La especie del embrión.
- ◆ El estadio de desarrollo embrionario.
- ◆ El ratio superficie/volumen del embrión.
- ◆ El crioprotector utilizado.
- ◆ La temperatura de exposición.

Dentro de los sistemas de equilibrio (inicialmente diseñados para la congelación de embriones *in vivo*), la técnica más utilizada en el caso de los EPIV es la congelación en EG 1,5M en presencia de sacarosa. El equilibrio se alcanza a -7°C (T^a de seeding) para después, realizar un descenso de la temperatura hasta los -32°C a una velocidad de 0,3°C/min (22, 24).

2. VITRIFICACIÓN

La vitrificación es un sistema por el cual, tras un enfriamiento ultrarrápido, se produce un incremento en la viscosidad del medio que contiene el embrión, formándose un estado sólido pero sin cristalización (estado vítreo), eliminándose los problemas derivados de este proceso (8, 32, 33, 36). La prevención del fenómeno de cristalización se consigue utilizando elevadas concentraciones de crioprotectores y altas velocidades de enfriamiento y calentamiento. La aceleración de la velocidad de los cambios de temperatura ofrece dos ventajas: permite disminuir el tiempo de contacto entre el embrión y los agentes crioprotectores, con el consiguiente beneficio derivado de la disminución de los efectos tóxicos y osmóticos, y reduce también el riesgo de que se produzcan lesiones por la exposición a bajas temperaturas debido al rápido paso por la zona de "temperatura crítica".

Las células sufren una deshidratación osmótica previa al enfriamiento, por una equilibración en una solución altamente concentrada de crioprotectores (< 6M). Ello determina una serie de cambios en el volumen osmótico de los embriones durante el proceso de crioconservación, sin que se produzca la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento, almacenamiento o descongelación.

Las soluciones de vitrificación pueden contener DMSO, propilenglicol, etilenglicol, incluso glicerol, solos o en combinación, y en concentraciones muy elevadas.

La vitrificación ha sido aplicada con éxito en varias especies animales, y ofrece muy interesantes perspectivas, dados la simplicidad del método (no se requiere equipamiento de congelación controlada) y los esperanzadores resultados obtenidos hasta la fecha.

En general, las mejores técnicas apuntan a la utilización del sistema basado en la vitrificación, con concentraciones muy elevadas del crioprotector (EG hasta 5,5 o 6 M), equilibración a temperatura ambiente, enfriamiento superrápido en vapores de Nitrógeno e introducción en NL.

Los embriones seleccionados para vitrificación se equilibran en 2 o más pasos a temperatura ambiente en diferentes soluciones con concentraciones crecientes de crioprotectores (6). El paso del embrión por la solución final de vitrificación no suele superar los 30 segundos. La pajueta se sella y se mantiene de forma horizontal en vapores de Nitrógeno durante 2-3 minutos (velocidad de enfriamiento 200°C/min), para pasarla luego directamente al NL.

Para la descongelación, las pajuelas se agitan en un baño de agua a 22°C durante 10-15 segundos. Diferentes baños (entre 2 y 5 dependiendo de la técnica) permiten la eliminación del crioprotector previamente a su transferencia o puesta en cultivo.

El uso de esta técnica tiene los inconvenientes derivados de los posibles efectos tóxicos de la utilización de los CP en concentraciones muy altas, que en la actualidad están controlados. Además, no permite la transferencia directa del embrión a la receptora (requiere manipulación), lo que supone una dificultad para su aplicación en el campo.

La vitrificación produce fenómenos de degeneración celular en el embrión con relación a embriones no vitrificados (16, 17) pero que no parecen afectar a los índices de gestación con relación a un sistema clásico de congelación lenta (34). Método Open Pulled Straw (OPS; 32,33)

Aunque lo estemos considerando de forma independiente, es una variante del sistema de vitrificación. La mayor parte de los métodos de vitrificación utilizan pajuelas "mini" francesas (0,25 ml) que, debido a sus dimensiones, no permiten alcanzar velocidades de enfriamiento y calentamiento que sobrepasen los 2000°C/min. Teniendo en cuenta que la relación volumen/superficie en contacto con el crioprotector es uno de los factores que más influencia tiene sobre las tasas de supervivencia postdescongelación, este sistema ofrece la posibilidad de disminuir los efectos perjudiciales de las soluciones crioprotectoras. Para ello, utilizan velocidades de enfriamiento y calentamiento superiores a los 20.000°C/min, y tiempos de contacto con la solución crioprotectora inferiores a los 30 segundos (a una temperatura de -180°C).

De una forma muy esquemática, el procedimiento de trabajo se basa en la utilización de unas pajuelas especiales cuyo diámetro ha sido reducido hasta 0,8 mm (el diámetro inicial de una pajuela clásica es de 1,7 mm), y el grosor de las paredes a 0,07 mm (grosor inicial 0,15 mm). Estos cambios en las características de las pajuelas permitirán un mayor contacto entre las células y la fuente de frío, con lo que las velocidades de enfriamiento se incrementan notablemente.

Los embriones, que previamente habremos dispuesto en microgotas conteniendo la solución crioprotectora, entran en la pajuela cuando hacemos contactar ésta con la microgota, por un fenómeno de capilaridad. Inmediatamente después, podremos sumergir la pajuela en NL.

Para el proceso de descongelación, bastará con sumergir la pajuela en el medio de descongelación elegido. Una vez descongelado el contenido de la misma, los embriones saldrán de la pajuela también por capilaridad.

Las ventajas que ofrece el sistema OPS son:

- ◆ Altas velocidades de enfriamiento y calentamiento. Los cambios de temperatura en este sistema son hasta 10 veces más rápidos que en el sistema clásico de vitrificación, con pajuelas estándar. Las razones para que se produzca este hecho son:
 - El reducido volumen de solución que tiene cabida en las pajuelas OPS (0,5 ml vs 5 ml en las pajuelas normales).
 - El contacto directo entre la fuente de frío o de calor.
 - La delgadez de la pared de las pajuelas OPS.
- ◆ Rápido y fácil cargado de los embriones en las pajuelas.
- ◆ Menos riesgo de lesiones de la zona pelúcida, fenómeno muy corriente cuando los embriones son enfriados o calentados muy rápidamente
- ◆ Dilución inmediata de los agentes crioprotectores durante el proceso de calentamiento.

El único inconveniente de esta técnica es la posibilidad de contaminación, al contactar el medio de mantenimiento que contiene el embrión directamente con el NL. Este problema puede solventarse utilizando nitrógeno líquido filtrado para el proceso de enfriamiento de la pajuela.

A pesar de las importantes diferencias existentes entre ambos tipos de métodos y de que los resultados en términos de gestaciones tras transferencia aún no son concluyentes (34), cabe subrayar que, básicamente, los objetivos perseguidos son, a grandes rasgos, los mismos: deshidratación de las células previa al almacenamiento en NL, y prevención de los posibles efectos deletéreos, de la toxicidad química y de la congelación intracelular. Un método ideal de criopreservación requiere la optimización de cada uno de los pasos del procedimiento, teniendo en cuenta el tamaño, la permeabilidad y las características fisiológicas de los constituyentes celulares, que nos determinarán la adición del crioprotector, la curva de enfriamiento, la inducción de la formación de hielo, el proceso de congelación y el almacenamiento del embrión, así como el método de descongelación y la eliminación del crioprotector adecuados.

No obstante todos estos aspectos, queda mucho por estudiar con relación a la criobiología del EPIV. Es posible que sus especiales características le hagan sensible a una serie de factores hasta ahora no considerados, y que explicarían las diferencias de supervivencia existentes tras congelación/descongelación de ambos tipos de embriones.

BIBLIOGRAFÍA

1. AETE. Statistic data of the bovine embryo transfer activity in Europe for 1999. In: proceedings of the 16th AETE Scientific Meeting, Santander (Spain) 2000 pp 27-69.

2. Díaz, E. Fecundación *in vitro* en ganado bovino: alternativas de cultivo y congelación de embriones. Aplicación a ovocitos obtenidos mediante punción transvaginal guiada ecográficamente. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Abril 1999.
3. Díez C, Le Bourhis D, Heyman Y, Degrolard J, Guyader-Joly C, Renard JP. Effect of partial lipid removal from bovine zygotes on further survival and freezing tolerance of *in vitro*-produced blastocysts. *Theriogenology* 2001; 55 (4): 923-936.
4. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of normal piglets after cytoskeletal stabilization of embryos and cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 1997; 49 (1): 345 abstr.
5. Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996; 45 (1): 17-26.
6. Donnay I, Auquier Ph, Kaidi S, Carolan C, Lonergan P, Mermillos P, Massip A. 1998. Vitrification of IVP blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim. Reprod. Sci.* (52): 93-104.
7. Dorland M, Gardner DK, Trounson AO. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert.* 1995; Abstr. Ser. 13: 70.
8. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984 Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* (21): 407-426.
9. Farin PW, Crosier AE and Farin CE, 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 55: 151-170.
10. Fukuda Y, Ichikawa M, Nahito K y Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* (42): 114-119.
11. Greve T, Avery B, Callesen H. 1993. Viability of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* (28): 645-654.
12. Guyader-Joly C. 1998 Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit *in vitro*. *Elevage et Insémination* 288: 3-23.
13. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Mc Cauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JA, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995; 43: 141-152.
14. Holm P and Callesen H, 1998. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev*, 38:579-594.
15. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of the inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fert.* (90): 279-284.
16. Kaidi S, Van Langendonck A, Massip A, Donnay I. 1999. Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for vitrification of IVP bovine embryos. *Theriogenology* (52): 515-525.
17. Kaidi, S, Donnay I, Massip A, Dessy F. 2000. Effect of freezing or vitrification on the quality of *in vitro*-produced bovine blastocysts. *Theriogenology* (53-1): 257.
18. Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 1993; 40: 81-94.
19. Leibo SP, Pollard JW, Martino A. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1995; 43: 265 abstr.
20. Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. 1996. *Anim Reprod Sci* 42: 45-53.
21. Massip A, Van der Zwalmen P, Ectors, F. 1987. Cryoconservation de l'embryon bovin: techniques et résultats. *Ann. Med. Vet.* (131): 515-528.
22. Massip A, Mermillod P, Dynnes A. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J Reprod Fert* 1993; 97: 65-69.
23. Massip A, Mermillod P, Dynnes A. Morphology and biochemistry of *in vitro*-produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reprod* 1995; 10(11): 3004-3011.
24. Massip A, Mermillod P, Van Langendonck A, Dynnes A. Veaux issus d'embryons produits *in vitro*, non congelés ou congelés. *Annales de Médecine Vétérinaire* 1994; 138: 333-338.
25. Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994;41:101-106.
26. Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* (28): 237-245.
27. Rieger D, Guay P. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. *J Reprod Fert* 1988; 83: 585-591.
28. Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. *J Reprod Fert* 1992; 95: 585-595.
29. Thompson JG, Gardner DK, Pug, PA, McMillan WH, Tervit HR. Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development embryos. *J Repr Fert* 1994; Abstract Series 13: 25.
30. Thompson JG. Comparison between *in vivo* derived and *in vitro* produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fert Dev* 1997; 9: 341-354.
31. Thompson JG, Cox S, McGowan LT, Tervit HR. Development and metabolic activity of bovine *in vitro*-produced blastocysts cultured in the presence of 2,4-dinitrophenol during compaction and blastulation. *Theriogenology* 2000; 53: 303 abstr.
32. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Callesen H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Repr. Dev.* (51): 53-58.
33. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2000 60-61: 357-364.
34. Van Langendonck AM, Den Daas JHG, Kruij TA, Rall WF. 1995. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology* 32 (2): 157-67.

35. Van Soom A, Boerjan M, Ysebaert MT and De Kruif A, 1996. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Mol Reprod Dev*, 45:171-182.
36. Watson PF, Morris GJ. Cold shock injury in animal cells. In: *Temperature and Animal Cells* (K. Bowler and B.J. Fuller, Eds.), 1987 pp. 311-340.
37. Whittingham DG. 1980: Principles of embryo preservation. In: *Low temperature preservation in medicine and biology*. (MD Ashwood-Smith and J Farrant Eds.). Pitman Medical, Tunbridge Wells, p 65-83.
38. Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF, Kruip AM. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single embryo transfer. *Theriogenology* 1994; 42: 1275-1284.

Volver a: [Transplante embrionario](#)