Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Optimización de métodos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos

Martínez, Alejandro Gustavo

2006

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Martínez, Alejandro Gustavo. (2006). Optimización de métodos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Martínez, Alejandro Gustavo. "Optimización de métodos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS Y OVINOS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: ALEJANDRO GUSTAVO MARTÍNEZ
Director: DR. MARCELO ANTONIO DE LAS HERAS
Consejero de estudios: DRA. MARÍA CRISTINA MAGGESE

CENTRO DE INVESTIGACIONES REPRODUCTIVAS
PÉREZ COMPANC

Buenos Aires, 2006

OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS Y OVINOS

Jurado: _____

Firma: _____

Calificación: _____

Jurado: _____

Firma: _____

Calificación: _____

Jurado: _____

Firma: _____

Calificación: _____

OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS Y OVINOS

La criopreservación de embriones se ha transformado en una práctica importante dentro de los métodos de reproducción asistida en diversas especies animales. La sensibilidad de los embriones a la criopreservación difiere de acuerdo a variables, tales como la especie, el estadio de desarrollo y el origen del embrión.

El objetivo del presente trabajo ha sido adaptar las técnicas de criopreservación estándar para ser usadas en embriones bovinos y ovinos producidos in vivo e in vitro. Para ello se realizaron evaluaciones post criopreservación cultivando los embriones. Los tratamientos que mostraron mejores resultados in vitro fueron seleccionados para las evaluaciones mediante transferencias.

Los resultados muestran que: 1) las soluciones de criopreservación formuladas con etilenglicol tienen mayor habilidad para conservar los embriones que aquellas que contienen glicerol o propilenglicol, 2) el agregado de bajas concentraciones de sacarosa en las soluciones de incorporación y en las de remoción del crioprotector es beneficioso, 3) la transferencia directa de embriones bovinos producidos in vivo permite alcanzar tasas de éxito similares a los métodos que involucran varios pasos de remoción, esto, sumado a su simplicidad, lo hace un método práctico para ser aplicado en condiciones de campo, 4) la vitrificación es un método aceptable con resultados comparables al congelamiento lento, 5) los embriones producidos in vitro tienen tasas de éxito menores que los producidos in vivo, 6) los terneros y los corderos provenientes de embriones producidos in vitro tienen alto peso al nacimiento, esto provoca un

aumento en los partos distócicos. La menor tasa de éxito y el alto peso al nacer, limitan el empleo de los embriones producidos in vitro en sistemas productivos.

La evidencia obtenida en este trabajo nos permitió adaptar los protocolos de criopreservación para cada especie y tipo de embrión estudiado, obteniendo la máxima eficiencia en el proceso de criopreservación con las herramientas disponibles en la actualidad.

Palabras clave: Bovinos, ovinos, congelamiento lento, vitrificación, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, sacarosa, fertilización in vitro

ADAPTATION OF CRYOPRESERVATION METHODS FROM BOVINE AND OVINE EMBRYOS

Embryo cryopreservation has become an important technique within the methods of assisted reproduction in diverse animal species. Embryo sensitivity to cryopreservation differs according to several variables, such as the species, the stage of development, and the embryo origin.

The aim of this study was to adapt standard cryopreservation protocols to in vivo- and in vitro-produced bovine and ovine embryos were used; to this end, post-cryopreservation assessments were made by culturing the embryos. The treatments that yielded the best results in vitro were selected for evaluation through transfer.

The results show that: 1) cryopreservation solutions containing ethylene glycol have a greater ability to preserve embryos than those containing glycerol or propylene glycol, 2) addition of sucrose in a low concentration to both cryoprotectant addition and removal solutions has a beneficial effect, 3) direct transfer of in vivo-produced bovine embryos achieves success rates similar to the methods that involve several removal steps in the laboratory, which, along with its simplicity, makes it a practical method to be applied in field conditions, 4) vitrification is an acceptable method comparable to conventional slow freezing, 5) in vitro-produced embryos have lower success rates than in vivo- produced embryos, 6) calves and lambs from in vitro-produced embryos have a high birth weight, which causes an increase in dystocial parturition rates. Both conditions, low pregnancy rates and high birth weights, limit the use of these type of embryos in production systems.

The results of the present study have allowed us to adapt cryopreservation protocols for each species and type of embryo studied, in order to achieve the highest efficacy in the cryopreservation process using the currently available tools.

Key words: Bovine, ovine, slow freezing, vitrification, glycerol, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, in vitro fertilization

AGRADECIMIENTOS

Espero en este momento que mis limitaciones como escritor no me impidan expresar en forma cabal mi agradecimiento a cuantos de una forma u otra estuvieron involucrados en todos los eventos que terminaron en la presentación de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a Mamá y Papá, porque su recuerdo es mi guía, y porque gracias a su esfuerzo y su apoyo he podido concretar todos mis logros.

Quiero agradecer especialmente a Marcelo de las Heras, mi Director de Tesis, por ser, además de un gran amigo, guía y consejero.

A mi "hermano" en la biología Alberto Valcárcel, por estar siempre junto a mi y haber compartido incontables horas de trabajo.

A las Doctoras Cristina Maggese y Graciela Guerrero, porque me abrieron las puertas del Laboratorio de Embriología Animal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, dándome mi primer lugar de trabajo.

A la Fundación Margarita Pérez Companc, porque en sus instalaciones y con su apoyo financiero fueron realizados todos los estudios que componen el presente trabajo.

A los Doctores Cecilia Furnus y Daniel de Matos por haber llevado a cabo en forma desinteresada la producción in vitro de embriones.

A los Doctores Guillermo Brogliatti y Gabriel Iorio quienes estuvieron a cargo de la obtención y de la transferencia de los embriones.

A los Doctores Daniel Moses y Mario Matkovic quienes colaboraron en el desarrollo de los experimentos.

No quiero olvidar a mis hermanos, tías y amigos porque en todos estos años siempre me alentaron para que siga adelante.

En forma muy especial quiero agradecerle a Estela porque más que mi compañera, es el faro sin el cual no podría navegar. Sin su ayuda nada de lo que he hecho hubiera sido posible.

Por último quiero agradecer a Juan Cruz y Laura, porque gracias a ellos tengo días y noches con Sol en mi cielo. Ellos son los destinatarios de todos mis esfuerzos.

A TODOS MUCHAS GRACIAS,

Gustavo

Inútil es creer que el paraíso

es sólo la igualdad, las nuevas leyes;

el sueño se hace a mano y sin permiso

arando el porvenir con viejos bueyes.....

Silvio Rodríguez

ÍNDICE

Abreviaturas Pág. 1

1. Introducción general

1.1. Los embriones Pág. 3

1.1.1. Fisiología del desarrollo embrionario Pág. 3

1.1.2. Manipulación de embriones en sistemas productivos Pág. 14

1.1.3. Obtención de embriones Pág. 19

1.2. La criopreservación Pág. 30

1.2.1. Generalidades Pág. 30

1.2.2. Principios de criobiología Pág. 33

1.2.3. Aplicaciones de la criopreservación de embriones Pág. 43

2. Objetivos de la presente investigación Pág. 46

3. Materiales y métodos

3.1. Drogas y reactivos Pág. 48

3.2. Obtención de embriones Pág. 49

3.2.1. Producción de embriones bovinos obtenidos in vivo Pág. 49

3.2.2. Producción de embriones bovinos obtenidos in vitro Pág. 50

3.2.3. Producción de embriones ovinos obtenidos in vivo Pág. 52

3.2.4. Producción de embriones ovinos obtenidos in vitro Pág. 53

3.3. Protocolos de criopreservación Pág. 55

3.3.1. Protocolos de congelamiento lento Pág. 55

3.3.2. Protocolos de vitrificación Pág. 57

3.4. Evaluación de la sobrevida embrionaria post congelamiento Pág. 58

3.4.1. Evaluación in vitro de los tratamientos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos Pág. 58
3.4.2. Evaluación in vivo de los tratamientos de criopreservación de embriones bovinos Pág. 59
3.4.3. Evaluación in vivo de los tratamientos de criopreservación de embriones ovinos Pág. 60
3.5. Análisis estadístico Pág. 61

4. Criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo

4.1. Introducción Pág. 63
4.2. Resultados Pág. 64
4.2.1. Congelamiento lento de embriones bovinos obtenidos in vivo con glicerol y etilenglicol Pág. 64
4.2.2. Efecto del tiempo de equilibrado del crioprotector en el protocolo de transferencia directa Pág. 65
4.2.3. Protocolos de congelamiento con transferencia directa, empleando etilenglicol o propilenglicol., combinados con diferentes concentraciones de sacarosa Pág. 66
4.3. Discusión Pág. 71

5. Criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vitro

5.1. Introducción Pág. 74
5.2. Resultados Pág. 75
5.2.1. Efecto del congelamiento lento con glicerol adicionado en 1 y 2 pasos en la sobrevida in vitro de embriones bovinos obtenidos in vitro Pág. 75
5.2.2. Efecto de la vitrificación con las soluciones Pg+Gli y EFS en la sobrevida in vitro de embriones bovinos obtenidos in vitro Pág. 76

5.2.3. Efecto de la vitrificación con las soluciones EFS, EFSm y Eg+Gli en la sobrevida in vitro de embriones bovinos obtenidos in vitro Pág. 76
5.2.4. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la vitrificación sobre embriones bovinos obtenidos in vitro Pág. 77
5.2.5. Efecto del congelamiento lento y de la vitrificación en la sobrevida luego de la transferencia de embriones bovinos obtenidos in vitro Pág. 77
5.3. Discusión Pág. 90

6. Criopreservación de embriones ovinos obtenidos in vivo

6.1. Introducción Pág. 94
6.2. Resultados Pág. 95
6.2.1. Efecto del glicerol y del etilenglicol como crioprotectores en el congelamiento lento de embriones ovinos obtenidos in vivo Pág. 95
6.2.2. Efecto de la cantidad de pasos de remoción del etilenglicol en el congelamiento lento de embriones ovinos obtenidos in vivo Pág. 96
6.2.3. Efecto de dos soluciones de vitrificación en la sobrevida de embriones ovinos obtenidos in vivo Pág. 97
6.3. Discusión Pág. 104

7. Criopreservación de embriones ovinos obtenidos in vitro

7.1. Introducción Pág. 107
7.2. Resultados Pág. 108
7.2.1. Efecto del congelamiento lento con glicerol y etilenglicol sobre embriones ovinos obtenidos in vitro Pág. 108
7.2.2. Efecto de la vitrificación con las soluciones Pg+Gli y EFS

en la sobrevida in vitro de embriones ovinos obtenidos in vitro Pág. 108
7.2.3. Efecto de la vitrificación con las soluciones EFS y Eg+Gli en la sobrevida in vitro de embriones ovinos obtenidos in vitro Pág. 109
7.2.4. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la vitrificación sobre embriones ovinos obtenidos in vitro Pág. 109
7.2.5. Efecto del congelamiento lento y de la vitrificación en la sobrevida luego de la transferencia de embriones ovinos obtenidos in vitro Pág. 110
7.3. Discusión Pág. 118

8. Conclusiones generales Pág. 122

9. Publicaciones Pág. 124

10. Bibliografía Pág. 125

Apéndice Pág. 156

ABREVIATURAS

AA = Antibiótico-antimicótico

BME = Aminoácidos esenciales

BSA-FAF = Albúmina sérica bovina fracción V libre de ácidos grasos

COCs = Complejo Cúmulus-Oocito

DPBS = Solución buffer fosfato salina de Dulbecco

DS = Desvío estándar

Eg = Etilenglicol

FAO = Organización Mundial para la Alimentación

FSH = Hormona folículo estimulante

Gli = Glicerol

GnRH = Hormona liberadora de gonadotrofinas

i.m. = Intramuscular

i.v. = Intravenoso

ICSI = Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

IVM = Maduración in vitro

LH = Hormona luteinizante

LN_2 = Nitrógeno líquido

MAP = Acetato de medroxiprogesterona

MEM = Aminoácidos no esenciales

pFSH = FSH porcina

Pg = Propilenglicol

PMSG = Gonadotrofina sérica de yegua preñada

Sac = Sacarosa

SFB = Suero fetal bovino

SOFm = Synthetic Oviduct Fluid modified

TCM 199 = Tissue Culture Medium 199

UI = Unidades internacionales

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. LOS EMBRIONES

Se estima que al momento del nacimiento una hembra bovina u ovina poseen un promedio de 150,000 folículos primordiales (Diancourt y col., 1993). Aunque cada uno de esos folículos tiene el mismo potencial de crecimiento durante la vida reproductiva del animal adulto y la misma posibilidad de generar un descendiente de la especie, la mayoría de ellos degenera (99,9%). Sólo un número limitado de esos folículos finalmente ovulará, será fertilizado y producirá un embrión. Es por ello que en las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas para potenciar la capacidad reproductiva de estas especies a través del aumento en el número de embriones capaces de generar una cría.

1.1.1. Fisiología del desarrollo embrionario

Función ovárica

La principal función del ovario en los mamíferos es regular el uso de la reserva de oocitos hasta su agotamiento. De toda la masa de folículos en crecimiento, sólo unos pocos llegarán a la ovulación (liberación de la gameta femenina) mientras que la mayoría irán a la atresia.

Otra función del ovario es el de preparar el útero para recibir al embrión durante la implantación, gracias a la transformación del folículo ovulatorio en un cuerpo lúteo. Si no hay fertilización el cuerpo lúteo sufre regresión, la cual es seguida por el crecimiento de un nuevo folículo ovulatorio y una nueva ovulación.

El oocito es una célula de gran tamaño, con escasa irrigación directa, hecho que provoca su total dependencia de las células de la granulosa que lo rodean para satisfacer sus requerimientos funcionales.

Las células germinales primordiales o gonocitos se diferencian tempranamente durante el desarrollo embrionario y emigran a la zona de los órganos genitales. Crecen y se dividen por mitosis para formar ovogonias, células que presentan un gran núcleo y poco citoplasma de apariencia granular. Esta proliferación celular es máxima en la etapa media de la vida fetal, declinando luego hasta el nacimiento. La característica sobresaliente de las ovogonias es la presencia de puentes citoplasmáticos intercelulares que permiten la comunicación entre ellas, ya que existe continuidad citoplasmática.

Las ovogonias comienzan a trasformarse para dar lugar a los oocitos primarios: Aumentan su tamaño, se acumula matriz citoplasmática y organelas. Esta transformación ocurre en la mayoría de los mamíferos durante la vida fetal.

El oocito primario realiza la primera división meiótica, luego de la cual su núcleo está listo para entrar en una etapa relativamente inactiva por tiempo indeterminado. La división meiótica no se reanudará hasta alcanzar la madurez sexual. El oocito en reposo presenta un gran núcleo excéntrico. Durante este período sigue el aumento en el número y la complejidad de las organelas citoplasmáticas.

Cuando el oocito se rodea completamente de células foliculares, su superficie se hace más irregular debido a que comienza a enviar prolongaciones hacia las células foliculares vecinas y aparecen microvellosidades. Las membranas del oocito y de las células foliculares se encuentran muy próximas e incluso en ciertos puntos pueden observarse engrosamientos que parecen unirlas. Comienza a ponerse en evidencia la estrecha vinculación entre oocito y células foliculares que mencionamos al comenzar esta sección.

En el momento de la madurez sexual la Hormona Folículo Estimulante (FSH) desencadena el proceso de maduración del oocito y del folículo primordial. Entre las membranas plasmáticas del oocito y de las células foliculares comienza a formarse la zona pelúcida, la cual está compuesta por glicoproteínas, y será la encargada de dar especificidad de especie al proceso de fertilización.

Cuando el folículo primario se trasforma en folículo secundario se completa la formación de la zona pelúcida. Los cambios citoplasmáticos en el oocito son prácticamente nulos, pero dentro del núcleo se reasume la primera división meiótica, como consecuencia de la cual el oocito primario se trasforma en oocito secundario originando el primer corpúsculo polar, que permanece retenido entre la membrana plasmática y la zona pelúcida.

Al acercarse el momento de la ovulación aparece entre la membrana plasmática del oocito y la zona pelúcida un espacio que se llena de un líquido semejante al licor folicular: La cavidad perivitelina. Además, desaparecen las microvellosidades de la membrana plasmática y los procesos citoplasmáticos de las células foliculares.

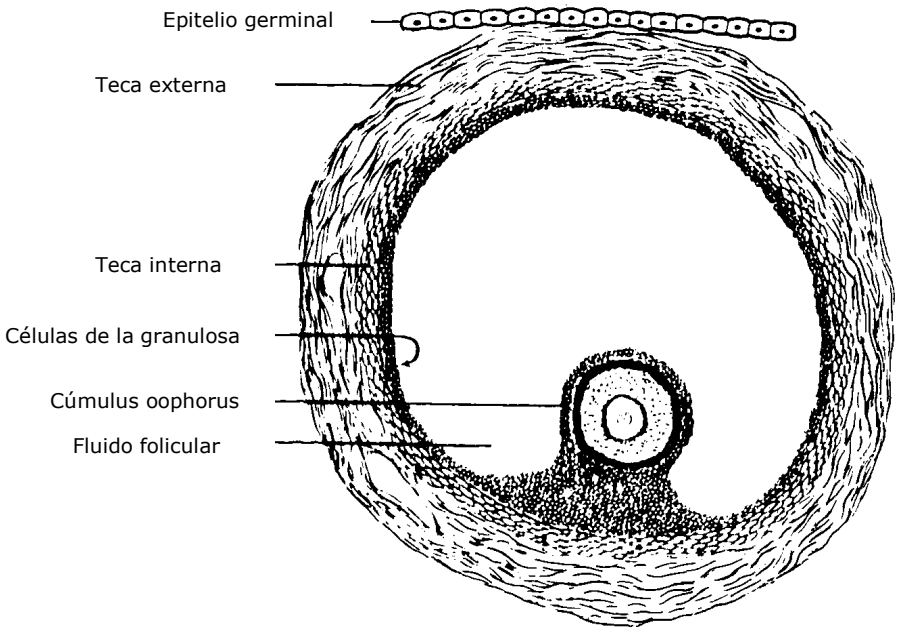
El folículo más pequeño que se encuentra en el ovario es el folículo primordial, formado por el oocito rodeado por células de la granulosa aplanadas. Cuando este adquiere una capa completa de células cúbicas alrededor del oocito, se transforma en intermediario, y finalmente en un folículo primario. La aparición de una segunda capa de células de la granulosa caracteriza al folículo secundario. Los folículos primordiales, intermediarios y primarios son los componentes del almacenamiento ovárico que será usado más tarde durante la vida.

En un folículo secundario grande, se puede detectar la formación de la zona pelúcida alrededor del oocito. Cuando puede detectarse la teca interna formada por células epiteliales, el folículo secundario se transforma en preantral. En este estadio, se pueden distinguir los receptores de la Hormona Luteinizante (LH) y FSH en la teca y la granulosa, respectivamente. Por lo tanto las gonadotrofinas ya pueden modular su crecimiento.

La transformación del folículo secundario en antral está determinada por la formación del antrum, cavidad llena de líquido folicular que contiene el oocito y las células foliculares. El folículo antral posee en la periferia la teca externa y hacia el interior la teca interna con la lámina basal en el límite con la granulosa. Rodeando al oocito se encuentra un grupo especializado de células de la granulosa denominadas células del cúmulus. El oocito queda rodeado por una

delgada capa de células foliculares, la corona radiata, ubicándose excéntricamente dentro del folículo y anclado a la pared de éste en un punto, el cúmulus oophorus (Figura 1).

Figura 1. Folículo antral de bovino con el oocito primario fuertemente adherido a las células de la granulosa (de Gordon, 1996).



Ovulación

En el momento de la ovulación el óvulo y las células de la corona radiata se desprenden de la pared del folículo, mientras que el líquido que escapa del antrum arrastra el óvulo a la superficie del ovario. En ese momento es capturado por la fimbria en el extremo de la trompa y comienza el camino a lo largo de la misma hasta el útero.

Una vez en la trompa comienzan en el núcleo los preparativos para la segunda división meiótica, que se completa durante la fertilización y que lleva a la

expulsión del segundo corpúsculo polar. Los restos del folículo, células foliculares y de la teca se diferencian por acción de la LH y se trasforman en células luteínicas, constituyendo el cuerpo lúteo o amarillo, activo secretor de la progesterona que ayuda a mantener el embarazo. En caso de no haber implantación, se produce la regresión del cuerpo lúteo.

Por acción de la LH, las células del folículo maduro secretan progesterona. Esta actúa a su vez a dos niveles diferentes:

1- Sobre los fibroblastos de la teca externa estimulando la secreción de enzimas proteolíticas que provocan la colagenólisis y la destrucción de mucopolisacáridos.

2- Sobre los mastocitos, originando una gran descarga de histamina cuyo efecto vasodilatador de arteriolas y constrictor venoso causa un gran aumento de la presión intracapilar que lleva a un estado de hiperemia.

Ambos fenómenos conducen a una pérdida de elasticidad del folículo, acompañada de flujo de plasma hacia su interior. Cuando el aumento en el volumen intrafolicular no puede ser sostenido por la pared del folículo, ésta se rompe y permite así la extrusión del óvulo maduro.

Por otra parte, la LH induce al activador de plasminógeno y provocando la liberación de plasmina, enzima proteolítica que coopera en los procesos líticos mencionados.

Finalmente, y también por acción de la LH, se sintetizan prostaglandinas en el ovario, que favorecen la contracción de las células musculares de la teca externa, de modo tal que el oocito es expulsado por la zona de menor resistencia de la pared folicular, ya debilitada por la acción de enzimas líticas.

Fertilización

Mientras que el oocito permanece inactivo desde el momento de la ovulación y es activado por la fertilización para completar su segunda división meiótica, el

espermatozoide eyaculado debe sufrir modificaciones durante su tránsito por los órganos genitales femeninos que le permitirán fertilizar al oocito. Este proceso es denominado "capacitación".

La capacitación ocurre mientras el espermatozoide recorre la cavidad uterina y el oviducto, mediada por la existencia de factores específicos uterinos y tubarios. Dentro del proceso de capacitación podemos reconocer dos fases: La activación y la reacción acrosómica.

La activación se define como el cambio en la motilidad del espermatozoide que ocurre durante su tránsito por el aparato genital femenino. El espermatozoide activado presenta mayor motilidad que el espermatozoide eyaculado. Este fenómeno se produce gracias a los cambios en la permeabilidad de la membrana del espermatozoide y al aumento de la entrada de Ca^{2+} a su interior (Brackett y Zuelke, 1993).

La reacción acrosómica ocurre durante la fase final de la capacitación en la vecindad del oocito. Este proceso consiste en la pérdida de la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa subyacente, como resultado de alteraciones de la membrana plasmática (pérdida de proteínas de superficie, formación de lisofosfátidos por acción de fosfolipasas, disminución del colesterol) que desestabilizan su estructura (Parrish y col., 1989). Esto unido al influjo de Ca^{2+} determina la fusión de las membranas plasmática y acrosómica externa, con formación de vesículas que se desprenden del espermatozoide.

La reacción acrosómica tiene por objeto permitir la liberación de las enzimas contenidas en el acrosoma, principalmente la hialuronidasa, la cual cumple la función de dispersar las células del cúmulus oophorus, y de exponer la membrana acrosómica interna. En esta membrana se localiza la acrosina, peptidasa responsable de hacer posible la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida.

Al ocurrir esta reacción comienzan a ponerse en juego los mecanismos de reconocimiento de gametas que determinan la especificidad de la fertilización. El espermatozoide se une a la zona pelúcida por su región acrosómica,

presumiéndose que en ella se localiza el sitio de reconocimiento, mientras que la fusión de la membrana vitelina del oocito con la membrana plasmática del espermatozoide tiene lugar por la región posacrosómica de la cabeza del espermatozoide (la zona delimitada por el segmento ecuatorial y el cuello).

Dentro del proceso de fertilización podemos reconocer tres etapas:

1) Reconocimiento y unión de las gametas: La unión es rápida y se produce a través de la zona pelúcida y la región acrosómica. En estado avanzado es prácticamente irreversible y muy específica. El proceso es mediado por la interacción del tipo "receptor-ligando" entre estructuras presentes en ambas células, la interacción del factor de la zona pelúcida con el receptor del espermatozoide y la consiguiente inhibición competitiva de su interacción con el oocito.

2) Fusión de membranas y penetración: El espermatozoide atraviesa la zona pelúcida por la acción combinada de su motilidad y de la acrosina y hace contacto con la membrana vitelina. Las microvellosidades del oocito rodean la cabeza del espermatozoide y se inicia la fusión por el segmento posacrosómico de la membrana plasmática del espermatozoide. Completado este proceso, se encuentra el núcleo del espermatozoide rodeado por el citoplasma conformando el "cono de fertilización".

3) Reacciones de prevención de la polispermia: Una vez que el oocito ha sido penetrado por un espermatozoide, se desencadenan una serie de reacciones que tienen por objeto impedir la entrada de otros espermatozoides, ya que la polispermia es habitualmente letal para el cigoto.

El mecanismo de prevención de la polispermia se inicia mediante la reacción cortical, como consecuencia de la cual se producen las reacciones de zona y vitelina.

La reacción cortical consiste en la exocitosis de los gránulos corticales ubicados por debajo de la membrana vitelina, dando como resultado la expulsión de su contenido al exterior y el agregado de sus membranas a la membrana vitelina. El

contenido de los gránulos corticales es rico en componentes con actividad enzimática similar a la tripsina. La proteólisis producida altera las glicoproteínas de la zona pelúcida, modificando los receptores para espermatozoides.

El conjunto de modificaciones de la zona pelúcida, como resultado de la exocitosis de los gránulos corticales se denomina "reacción de zona". La cual ocurre aproximadamente a los 15 min de producida la fertilización.

La inserción de la membrana de los gránulos corticales en la membrana vitelina produce una disminución de la fluidez de la misma. A estos cambios en la composición y características de la membrana se le suma el efecto de las enzimas proteolíticas liberadas por los gránulos corticales que alteran las proteínas de superficie, entre las cuales se hallan los factores de reconocimiento para el espermatozoide. Este conjunto de modificaciones se denomina "reacción vitelina" y tiene lugar entre 2 y 3 h después de la fertilización.

Desarrollo embrionario

El **cigoto** formado luego de la fertilización se divide en 2 blastómeras comenzando la segmentación, la cual continua durante el tránsito del embrión dentro del oviducto y después en el útero. En el estadio de 8 células el tamaño de las blastómeras comienza a disminuir.

El pasaje del embrión desde el oviducto al útero tiene lugar a los 4 días de la aparición del estro, en el estadio de 16-32 células, denominado **mórula en compactación**. Aquí las blastómeras individuales son difíciles de identificar una de otra y la masa celular ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

El 5º día, las blastómeras son más numerosos (más de 48 células) y coalecen, formando una masa compacta, este es el estadio denominado **mórula compacta**. El embrión ocupa el 60-70% del espacio perivitelino y su diámetro aproximado es 150 µm.

El 6º día se diferencian dos tipos celulares: Las células de la masa celular que en un futuro desarrollarán el feto y las células del trofoblasto que rodean la incipiente cavidad en formación: El blastocele. El embrión se convierte en **blastocisto temprano** y posee alrededor de 100 células.

El tamaño del blastocele comienza a aumentar, lo cual es acompañado por el adelgazamiento de la zona pelúcida. Se produce la desaparición del espacio perivitelino y un aumento dramático del diámetro del embrión (1,2-1,5 x) que llega a medir 200-230 µm y posee unas 200 células, alcanzando el estadio de **blastocisto expandido**. En este estadio, las membranas del trofoblasto, que producirán después las membranas fetales de la placenta, se sitúan en la periferia del blastocele. La masa celular se sitúa en uno de los polos del embrión para constituir el botón embrionario. El número relativo de células de la masa celular interna con respecto a las células del trofoblasto se encuentra en relación 1:2 (Skrzyszowska y Smorag, 1989).

Al finalizar la fase de expansión (8º día), se producen contracciones periódicas en el blastocisto, la zona pelúcida muy debilitada se fisura y permite en ese momento la salida del embrión.

Después de ser liberado de la zona pelúcida, el embrión posee unas 500 células y aumenta de tamaño para llegar a un diámetro aproximado de 500 µm en el 9º día; seguidamente entra en una fase de elongación. En este estadio el trofoblasto produce numerosas proteínas, entre ellas la trofoblastina que se opone a la actividad luteolítica de la prostaglandina F2alfa. El mantenimiento de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo permitirá la continuidad de la gestación (Betteridge y Flechon, 1988; Lonergan, 1992; Mannaerts, 1986; Ushijima y col., 1988).

A continuación se observa una serie fotográfica con los diferentes estadios por los que atraviesa el embrión de mamífero antes de la implantación (Figura 2).

Figura 2. Desarrollo embrionario desde el oocito maduro hasta el blastocisto eclosionado.

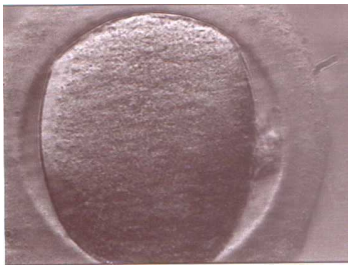


Foto 1 – Oocito maduro

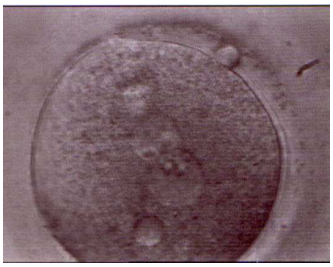


Foto 2 – Oocito fertilizado

Foto 3 – Embrión de 8 células

Foto 4 – Mórula compacta

Foto 5 – Blastocisto temprano

Foto 6 – Blastocisto expandido

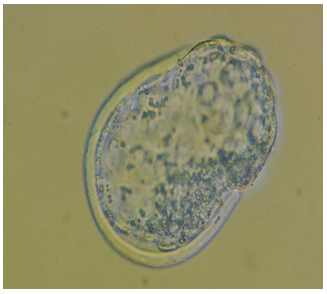


Foto 7 – Blastocisto eclosionando

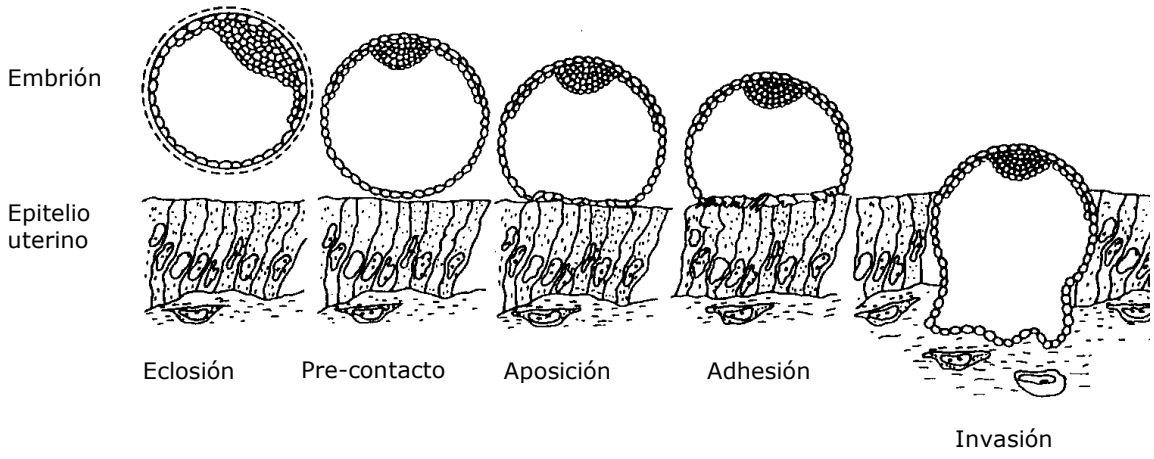
Foto 8 – Blastocisto eclosionado

Implantación

Bajo la influencia de los altos niveles de progesterona, durante la fase lútea del ciclo ovárico, disminuyen las contracciones uterinas. Esto permite que el blastocisto se adhiera a la superficie del endometrio (revestimiento uterino). Después de ello el trofoblasto emite prolongaciones que invaden el endometrio por digestión enzimática de los tejidos en busca del aporte sanguíneo (Figura 3). Luego, a medida que el mesodermo se une con el trofoblasto para formar el corion, se inicia un sistema real de vasos. Este es el comienzo de la parte fetal de la placenta, que proporciona nutrientes para el embrión y permite la eliminación de desechos hacia la circulación materna. Por otra parte, la placenta produce las hormonas necesarias para la conservación del embrión en el útero.

Los tejidos maternos reaccionan a la implantación del embrión formando una barrera de aspecto inflamatorio en torno al invasor. El endometrio continúa el desarrollo de sus glándulas y su circulación sobre todo en la zona de residencia del embrión. Se produce también un aumento en el tamaño y potencia de las fibras musculares. Esta serie de cambios constituyen la contribución materna a la placenta.

Figura 3. Diferentes fases de la implantación (de Thibault y col., 1993)



La implantación y la formación de la placenta son posibles sólo en el útero que ha sido preparado, primero por estrógenos y después por progesterona. El mantenimiento del embarazo también requiere la producción ininterrumpida de estas hormonas, particularmente progesterona, lo cual significa que el cuerpo lúteo debe estar activo y que debe surgir otra fuente para producción hormonal. El corion desde un principio secreta gonadotropinas que continúan la estimulación del cuerpo lúteo, ya que en esta época decae notablemente el aporte hipofisario de LH.

1.1.2. Manipulación de embriones en sistemas productivos

Los primeros intentos de transferir embriones de mamíferos fueron realizados en Gran Bretaña por George Romanes (1848–1894) y Walter Heape (1855–1929). Ambos, involucrados en una carrera por conseguir el éxito, utilizaron como modelo experimental al conejo.

Finalmente, fue Heape en 1890 quien logró la primera transferencia embrionaria exitosa de la historia, mostrando que embriones de conejo de una determinada raza podían ser gestados en el tracto reproductivo de hembras de otra raza sin ser afectados por el ambiente uterino (Heape, 1891, 1897b).

El primer registro de una transferencia embrionaria en especies de interés agropecuario fue hecho en el Colegio de Agricultura de Texas, por Warwick, Berry y Horlacher quienes, en 1932 y 1933, usaron esta técnica en ovinos y caprinos para investigar las causas que producían la pérdida fetal de híbridos de esas especies (Warwick y col., 1934; Warwick y Berry, 1949).

Luego de la Segunda Guerra Mundial, en varios países los científicos del área de la agricultura comenzaron a pensar seriamente en el uso de la transferencia embrionaria para programas de mejoramiento en bovinos. En esa época la inseminación artificial se estaba expandiendo rápidamente alrededor del mundo como un medio barato y efectivo de favorecer el mejoramiento genético de los rodeos. Mediante este método se podía hacer uso de todo el potencial de las

gametas de machos genéticamente superiores, esto llevó a pensar en la posibilidad de realizar lo mismo en las hembras empleando la transferencia embrionaria.

Tabla 1. Primeras transferencias exitosas en diversas especies:

ESPECIE	INVESTIGADORES	AÑO
Conejo	Heape	1890
Caprino	Warwick y Berry	1932
Ovino	Warwick y col.	1933
Rata	Nicholas	1933
Ratón	Fekete y Littie	1942
Bovino	Willett y col.	1951
Porcino	Kvasnitski	1951
Equino	Oguri y Tsutsumi	1974
Humano	Steptoe y Edwards	1978

Recién 25 años después del desarrollo de la inseminación artificial en bovinos se logró el éxito con la transferencia embrionaria. Esto fue realizado por Elwyn Willett en 1950, quien trabajaba para la American Foundation for the Study of Genetics en Madison, Wisconsin (Willett y col., 1951). Pero, pese a lo esperado, esto no provocó un gran desarrollo de la actividad, ya que la técnica se encontraba con la limitación de necesitar la transferencia quirúrgica de los embriones. Sin embargo, a mediados de los años 70, varios grupos de investigación habían desarrollado la recuperación y transferencia de embriones no quirúrgicas (Betteridge, 2003), provocando una expansión significativa de la transferencia embrionaria.

En las últimas tres décadas han sido desarrolladas varias técnicas relacionadas con la transferencia embrionaria que permiten incrementar el potencial reproductivo de diferentes especies. Entre ellas la principal ha sido la producción in vitro de embriones. Desde el comienzo los estudios desarrollados en diferentes especies animales y en humanos marcharon a la par (Biggers, 1984), sin embargo, todo el progreso que había sido realizado en animales fue eclipsado en 1976 por el nacimiento de Louise Brown, el primer "bebé de probeta" (Steptoe y Edwards, 1976). Este nacimiento llamó la atención pública sobre todos los aspectos de los trabajos sobre embriología como nunca antes, con consecuencias que todavía hoy persisten.

Otra técnica de alto impacto en el área de la transferencia embrionaria ha sido la criopreservación. Gracias a ella se han podido formar bancos de embriones no solo humanos o de animales de interés agropecuario sino también de especies en peligro de extinción. Una vez criopreservados se puede diferir en el tiempo la transferencia de los embriones o pueden ser transportados a cualquier otro sitio.

Finalmente, podemos enumerar algunas técnicas que han alcanzado menor grado de avance, ya sea porque cuando fueron creadas no lograron difusión masiva o porque se encuentran actualmente en desarrollo.

La primera de ellas la bisección de embriones por micromanipulación (Willadsen, 1979). Esta técnica abrió la puerta en la década de los años 80 a la biopsia de blastómeras para el sexado (Picard y col., 1985).

El entrenamiento en micromanipulación fue aplicado también en la producción de quimeras, animales transgénicos e, inclusive, clones mediante transferencia nuclear y transferencia de blatómeras (Prather y col., 1987; Prather y col., 1989; Stice y Robl, 1988; Willadsen, 1986).

Dentro del campo de la micromanipulación, en 1990, fue desarrollada la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Esta técnica está siendo ampliamente empleada en la reproducción asistida en humanos en aquellos casos donde la causa de la infertilidad en la pareja es de origen masculino.

Asociado al ICSI, se encuentra la producción de embriones sexados empleando la separación de espermatozoides X e Y, para la cual se emplea un citómetro de flujo (Betteridge, 2003).

Pero esta breve historia de la transferencia embrionaria no estaría completa si no se hace mención al último acontecimiento de gran importancia en esta área: El nacimiento de Dolly en el año 1996 y, su consecuencia inmediata, el dilema del uso de las células embrionarias totipotenciales (stem cells).

Mucho ha sido escrito acerca del impacto del logro de los doctores Ian Wilmut y Keith Campbell, al producir a Dolly. Sin embargo, más allá del progreso que esto trajo en la producción animal, hoy es aún temprano para saber su real alcance, no solo en esta área, sino en otras tales como la industria farmacéutica.

La transferencia embrionaria permite aumentar la cantidad de descendientes que una hembra puede producir en un año. El incremento del número de descendientes por hembra provee de un instrumento de selección tanto para la creación de líneas genéticas como para la difusión del progreso genético. Este método aporta por otra parte una solución al problema de la protección de genotipos amenazados de extinción.

Aceleración del progreso genético: La transferencia embrionaria se ha transformado en una herramienta muy empleada para realizar trabajos de mejoramiento genético en diferentes especies animales. La posibilidad de aumentar el número de descendientes por hembra confiere, entre otras ventajas, la posibilidad de realizar la sección de los futuros reproductores sobre un número mayor de animales, por lo que se puede aplicar una mayor presión de selección.

Por otra parte, la producción de un elevado número de descendientes ofrece la oportunidad medir el valor genético de las hembras por medio de la evaluación de los resultados obtenidos por sus hijas distribuidas en diferentes ambientes.

Por último, la posibilidad de acrecentar rápidamente la descendencia de las hembras jóvenes permite reducir el intervalo entre generaciones y aprovechar esta ventaja para difundir más rápidamente reproductores de alto valor genético.

Difusión de la mejora genética: El desarrollo de la inseminación artificial permite una amplia difusión de la mejora genética solo por vía paterna. Mientras que el transplante de embriones ofrece un medio eficaz para incrementar sensiblemente la difusión del potencial genético de ambos progenitores, aumentando a algunas decenas de hijos la descendencia posible de hembras de alto valor genético.

Protección de especies en peligro de extinción: Un cierto número de especies está amenazado de extinción a corto o mediano plazo. El mantenimiento del número mínimo de reproductores necesarios para la conservación de la biodiversidad es generalmente muy costoso y queda supeditado a alternativas sanitarias.

Existe en el Mundo un interés creciente en establecer programas de preservación de especies y razas en peligro de extinción. Estos programas no sólo incluyen especies salvajes sino también razas de especies de importancia agropecuaria. Las técnicas de producción in vitro podrían ser empleadas para preservar las diferentes razas sin perturbar su ritmo natural de reproducción, estableciendo bancos genéticos y minimizando las pérdidas causadas por la cacería o muerte natural.

En un trabajo publicado en 1993, Hall y Ruane, estimaron que de las 3831 razas y variedades de burros, búfalos, vacas, cabras, caballos, cerdos y ovejas existentes en el siglo 20, 618 (16%) estarían extinguidos para el año 2000. Por ello, la FAO decidió establecer 7 Bancos Regionales de Genética Animal para preservar la diversidad genética de razas nativas (Gordon, 1997). Dos de esos bancos fueron ubicados en Sudamérica (Argentina y Brasil), 2 en Africa (Etiopía y Senegal), 2 en Asia (China e India) y 1 en México (cubriendo el área de América Central y el Caribe). La iniciativa de la FAO incluye la compilación de un inventario mundial de razas nativas y propone la conservación de bancos de semen y embriones congelados de las razas elegidas.

Garantía sanitaria: A pesar de las medidas sanitarias vigentes en el ámbito internacional, la propagación de enfermedades infecciosas está todavía en la actualidad asociada al intercambio de animales vivos. Numerosos estudios, han

demostrado que el trasplante de embriones significa una barrera para la transmisión de agentes virales o bacterianos conocidos, (Stringfellow y Givens, 2000), dado que la zona pelúcida confiere al embrión de una barrera protectora natural que aísla las células embrionarias de la mayor parte de los agentes infecciosos que pueden contaminar al medio uterino.

En trabajos realizados en cabras (Chemineau y col., 1986) y en ovejas (Hare y col., 1988) se demostró que el trasplante de embriones previamente lavados, originarios de hembras seropositivas para el virus de la lengua azul de los ovinos (B.T.V.) permitió la creación de rebaños libres de esta enfermedad.

Usos comerciales: La posibilidad de multiplicar la descendencia de hembras de alto valor económico abre al trasplante de embriones multitud de posibilidades puramente comerciales. De hecho los intercambios de animales vivos además del riesgo sanitario que involucran, están actualmente limitados por el costo del transporte a larga distancia, por la puesta en cuarentena y por las dificultades de adaptación de los animales en el medio de destino (condiciones climáticas, alimentarlas y sanitarias). La comercialización de embriones se presenta como una forma sanitariamente satisfactoria y al mismo tiempo económicamente rentable cuando se trata de intercambio de material genético.

1.1.3. Obtención de embriones

Bajo el título de transferencia embrionaria se reúnen los pasos de producción, almacenamiento y uso de embriones de mamíferos desde el estadio de cigotas hasta el de blastocisto, durante el período que precede a la implantación. En los últimos años las especies principalmente estudiadas han sido los bovinos, los ovinos y los caprinos.

Debido a su complejidad y a sus limitaciones técnicas y fisiológicas, la transferencia embrionaria difícilmente reemplace a la inseminación artificial. Sin embargo, si es usada en forma apropiada en animales seleccionados, puede

ofrecer un excelente medio de progreso a través de la dispersión del mejor material genético.

Producción de embriones in vivo

Para realizar una adecuada producción de embriones transferibles deben estar bajo control dos pasos fundamentales: La superovulación y la fertilización.

El objetivo de la superovulación es incrementar en el número de folículos en crecimiento para ser ovulados. Esto se logra mediante el uso de inyecciones de gonadotrofinas durante la fase lútea del ciclo estral en los bovinos o en el final del tratamiento con progestágenos en los ovinos y los caprinos. Para lograr las condiciones óptimas se debe definir en forma adecuada tanto la dosis a emplear como el número de inyecciones por día en la que esta será suministrada (Chupin, 1988; Thibier y Guérin, 2000; Veiga-López y col., 2005).

En los bovinos, la producción alcanza en promedio unos 5 embriones transferibles. Sin embargo, existe una gran variabilidad en la respuesta ovárica, ya que el 30% de las donantes no produce embriones transferibles, y sólo el 45% produce 4 o más (Galli y col., 2003). La causa de esta variabilidad tiene dos componentes. Por un lado las diferencias entre animales en la cantidad de folículos y la sensibilidad al tratamiento, y por el otro las variaciones en la efectividad de los diferentes lotes de las preparaciones hormonales.

La LH en exceso o en defecto reduce la respuesta superovulatoria. Gracias a varios estudios realizados ha sido posible definir una relación óptima FSH:LH, la cual difiere de acuerdo a las diferentes especies y razas (Boland y col., 1991; Chupin, 1985). A partir de estos estudios se ha llegado al desarrollo de una preparación hormonal, de pituitaria porcina, que presenta FSH y LH en dos ampollas diferentes para adaptarlas a los requerimientos de cada caso en particular. Esta presentación se ha hecho más necesaria aun desde que estudios realizados en ovinos y caprinos demostrando que es posible mejorar la eficiencia

del tratamiento administrando secuencialmente dosis decrecientes de FSH y crecientes de LH (Kraemer, 1989).

El nivel de la respuesta ovárica depende del número y tamaño de los folículos presentes al comienzo de la estimulación. La presencia de uno o dos folículos grandes (10 mm de diámetro en los bovinos, y 6 mm en ovinos y caprinos) es perjudicial para el tratamiento (Driancourt, 2001). Pero si se administran agonistas de GnRH durante un período largo previo al tratamiento estimulatorio, estos folículos grandes desaparecen. De esta manera se logra que, durante el tratamiento, todos los folículos de tamaño pequeño sean estimulados, conduciendo a un incremento de la tasa de ovulación y decreciendo la variabilidad en la respuesta (Evans, 2003).

En ovinos y caprinos los tratamientos pueden ser repetidos cada 6 semanas. Pero se ha observado que, en general, las donantes experimentan una disminución de la respuesta superovulatoria a medida que se las someta a nuevos tratamientos (Driancourt, 2001). En caprinos, se han detectados anticuerpos anti-FSH después de repetidos tratamientos; observándose una correlación negativa entre los niveles de anticuerpos y la respuesta ovárica (Baril y col., 1988).

Luego del tratamiento de estimulación hormonal, las ovulaciones se producen en un rango de varias horas: 6 en la oveja, 12 en la cabra y 24 en la vaca (Baril y col., 1990; Chupin, 1985; Kraemer, 1989). Para obtener la mayor tasa de fertilización es necesario conocer precisamente el momento de la ovulación. La entrada en celo no está estrictamente relacionada con el momento de la ovulación y la detección del celo no puede ser usada como el único criterio para programar el momento de la inseminación.

Debido a que el intervalo entre el pico de LH y la ovulación es menos variable, conocer este pico es una buena forma de estimar el momento de la ovulación (Baril y col., 1990; Chupin, 1985; Kraemer, 1989; Souza y col., 1997).

Una vez calculado el momento de la ovulación se realiza la inseminación de la donante. La cual puede ser realizada mediante la cópula con un macho

seleccionado o mediante inseminación artificial (Baldasarre y col., 1992; Chupin, 1985; Kraemer, 1989).

Ocurrida la fertilización, los embriones producidos avanzan a lo largo del oviducto hasta alcanzar el útero, desde donde se recuperan por lavado de la cavidad uterina, antes de que se produzca la implantación. En los bovinos esta recuperación se realiza en forma no quirúrgica, empleando un catéter que se introduce a través del cuello, y a través del cual se llena y se vacía el útero con una solución de lavado (Gordon, 1996).

En los ovinos y caprinos, no se puede emplear la vía cervical debido a la difícil anatomía del cuello, por ello la única posibilidad es realizar la recuperación quirúrgica. Para ello se deben exponer ambos cuernos uterinos para poder realizar el pasaje de solución de lavado empleando jeringas y catéteres más delgados que los empleados con los bovinos (Gordon, 1997).

En los bovinos se puede repetir en varias oportunidades la recuperación transcervical de embriones. En contraste, en ovinos y caprinos, la recuperación quirúrgica produce adherencias, que limitan la posibilidad de repetir el tratamiento. Si la recuperación de embriones es realizada por vía laparoscópica se forman menos adherencias, lo que posibilita repetir el tratamiento hasta 7 veces en el mismo animal (Baldasarre y col., 1992).

Los embriones recuperados son posteriormente transferidos a una hembra receptora. En bovinos, la práctica más extendida es la transferencia transcervical, ya que es el método más sencillo y con el que se obtienen tasas de preñez que oscilan entre el 50 y 60%. Con la transferencia quirúrgica se obtienen tasas de preñez algo superiores, pero, debido a su complejidad se ha dejado de realizar (Betteridge, 2003). En ovinos y caprinos, se realiza la transferencia quirúrgica con tasas de éxito que oscilan entre el 50 y 60% (Baril y col., 1988; Kraemer, 1989; Thibier y Guerin, 2000). En todos los casos los embriones deben ser depositados en el cuerno uterino próximo al ovario en el que se encuentra el cuerpo lúteo funcional.

Los criterios de selección y preparación de las receptoras son dos: La presencia y apariencia del cuerpo lúteo en el momento de la transferencia y el grado de sincronía entre el estadio del embrión y el estado de receptividad del útero de la receptora (Broadbent y col., 1991; Peterson y Lee, 2003).

Producción de embriones in vitro

La producción in vitro de embriones representa una alternativa dentro de las técnicas de reproducción para mejorar la perfomance reproductiva y el avance genético en animales de interés agropecuario. Esta técnica permite transferir un gran número de embriones de padres seleccionados, solucionando problemas de fertilidad y expandiendo el potencial reproductivo de las donantes (Kajihara y col., 1991).

El proceso comprende tres pasos fundamentales: a) maduración de los oocitos, b) capacitación de los espermatozoides y fertilización de los oocitos, y c) cultivo de los cigotos obtenidos.

La maduración está caracterizada por el reinicio de la meiosis y la extrusión del primer cuerpo polar por parte del oocito. Las condiciones de cultivo empleadas para la maduración in vitro pueden influir significativamente en el éxito de la fertilización in vitro y el desarrollo embrionario posterior (Rose y Bavister, 1992).

Un punto clave para el éxito de la producción de embriones in vitro es realizar una apropiada selección morfológica de los oocitos a emplear en el proceso (Crozet, 1991). Un oocito con ooplasma homógeneo y con abundantes células del cúmulus rodeándolo, es el mejor indicador de la capacidad de madurar y de desarrollar un embrión (Brackett y Zuelke, 1993; De Loos y col., 1989; Fukui y Sakuma, 1980; Leibfried y First, 1979; Younis y col., 1989). Las células del cúmulus son necesarias para el transporte de nutrientes y señales químicas dentro y fuera de los oocitos (Moor y Seamark, 1986).

La adición de hormonas tales como FSH, LH y estradiol al medio de maduración in vitro beneficia la fertilización y el desarrollo embrionario (Bracket y col., 1989; Younis y col., 1989; Zuelke y Brackett, 1990).

Para que la fertilización in vitro tenga éxito se deberán reproducir las condiciones que el espermatozoide encuentra en el tracto femenino, ya que es en ese lugar donde el espermatozoide sufre los procesos de capacitación y reacción acrosómica.

Actualmente se usan medios con heparina para capacitar in vitro a los espermatozoides de toro (Greve y col., 1993a; Lu y col., 1987; Parrish y col., 1988), mientras que el espermatozoide de carnero es incubado en un medio con HEPES combinado con suero de oveja en estro para dicho proceso (Huneau y Crozet, 1989).

La muestra de semen es lavada y los espermatozoides móviles son separados de los inmóviles mediante swim-up (Parrish y col., 1986) o mediante gradientes de densidad (Van Soom y col., 1992). Finalmente, para lograr la fertilización, se incuba a los oocitos con una cantidad determinada de espermatozoides en medio de fertilización (Fukui y col., 1988).

Los primeros experimentos de fertilización in vitro no lograban alcanzar el desarrollo de los oocitos fecundados más allá del estadio de 8 a 16 células. En este estadio se producía un bloqueo imposible de sobrepasar en el cultivo in vitro de los cigotos, por ello se empleaba el cultivo in vivo en oviductos de vaca, oveja o coneja (Eyestone y First, 1989; Gordon y Lu, 1990; Lu y col., 1987; Sirard y Lambert, 1985; Xu y col., 1987;). Recién con el desarrollo de sistemas de cultivo in vitro más complejos se logró alcanzar los estadios de mórula y/o blastocisto con éxito (Furnus y col., 1998). Por otra parte se ha demostrado que medios de cultivo diferentes o diferentes suplementos proteicos de estos medios condicionan en los embriones producidos en ellos la capacidad de tolerar la criopreservación (Imai y col., 2002; Lane y col., 2003; Nedambale y col., 2004; Rizos y col., 2003; Yotsushima y col., 2004).

Los sistemas de cultivo disponibles en la actualidad incluyen los cocultivos, los medios condicionados y los medios sintéticos. En los cocultivos, los embriones son incubados en contacto con células somáticas. Para ello se utilizan células epiteliales, células del cúmulus u otros tipos celulares (Camous y col., 1984; Eyestone y First, 1989; Fukuda y col., 1990; Fukui y col., 1989; Heyman y Ménézo, 1987; Pavlok y col., 1989; Takada y col., 1990; Thibodeaux y col., 1992). Los medios condicionados emplean un precultivo de células del cúmulus u oviductales para luego cultivar los embriones en el medio enriquecido resultante (Kobayashi y col., 1992; Mermillod y col., 1993). Con respecto a los medios sintéticos, los embriones son cultivados en soluciones químicamente definidas cuyos componentes se encuentran en concentraciones que remedan los ambientes oviductal y uterino acordes al estadio de desarrollo del embrión (Bavister y Rose-Hellekant, 1992; de Matos y col., 1996; Fukui y col., 1991; Mc Laughlin y col., 1989).

Diferencias en la morfología y la bioquímica de los embriones obtenidos in vivo e in vitro

Tomando como modelo al embrión producido in vivo y comparándolo con el producido in vitro, podemos establecer una serie de diferencias tanto morfológicas como bioquímicas. Estas diferencias son producto de la influencia que ejerce el ambiente en el que ocurren la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario sobre ambos tipos de embriones (Tabla 2). Por ello, pese a que se puede producir embriones in vitro de aparente buena calidad a partir de oocitos inmaduros, las tasa de preñez de estos son un 20% menor que las de su contraparte obtenidos in vivo (Bracket y Zuelke, 1993; Greve y Madison, 1991; Hasler, 2003; Kane, 2003; Massip y col., 1995; Reichenbach y col., 1992; Van Soom y col., 1994; Wurth y col., 1994). Por otra parte, los embriones obtenidos in vitro son más sensibles a la criopreservación (Hasler, 2003; Kane, 2003; Leibo y Loskutoff, 1993; Wurth y col., 1994).

Tabla 2. Comparación del ambiente en que se desarrollan los embriones obtenidos in vivo e in vitro durante los estadios preimplantatorios (modificado de Rieger y Betteridge, 1989).

IN VIVO	IN VITRO
* Temperatura corporal constante	* Shocks térmicos
* Oscuridad completa	* Exposición a la luz del ambiente y del microscopio
* Tensión de O_2 y CO_2 controlada	* Exposición directa al gas atmosférico
* Pequeño volumen de secreciones en la periferia	* Gran volumen periférico
* Intercambio dinámico permanente entre el embrión y la madre	* Condiciones de cultivo estáticas con merma de metabolitos

Durante la maduración y la fertilización in vitro, se han observado anormalidades ultraestructurales en los oocitos, que podrían estar relacionadas con la baja capacidad de desarrollar hasta el estadio de blastocisto una vez fertilizados (Bilodeau-Goeseels y Panich, 2002; Hyttel y col., 1989 a,b; Krisher, 2004; Nagai, 2001). Esas anormalidades incluyen la falta de dispersión de los gránulos corticales y la falta de un adecuado reordenamiento mitocondrial.

Estudios comparativos entre embriones obtenidos in vivo e in vitro revelaron notables asimetrías en la capacidad de desarrollo entre ellos, reflejando diferencias en su morfología (Crosier, 2000; Van Soom y de Kruif, 1992). Los cigotos obtenidos in vivo tienen un gran espacio perivitelino, los embriones de 8 células poseen blastómeras uniformes y normales, las mórulas tienen buena compactación y los blastocistos poseen una masa celular interna bien definida. En contraste, en los embriones obtenidos in vitro, el espacio perivitelino del estadio de una célula es muy pequeño, en el estadio de 8 células los blastómeras son irregulares, la compactación de las mórulas no es muy evidente, y los blastocistos poseen una apariencia oscura y un formato irregular.

Varios estudios mostraron que los blastocistos bovinos obtenidos in vitro tenían menor número de células, proporcionalmente una menor masa celular interna, un incremento de la cantidad de vacuolas en el citoplasma y menor cantidad de complejos "cell junction" entre blastómeras (Iwasaki y col., 1990; Prather y First, 1993; Shamsuddin y col., 1992). Plante y King (1995) reportaron que las mitocondrias fueron las organelas que mostraron las mayores modificaciones durante el desarrollo in vitro de embriones bovinos. Encontraron una asociación entre estos cambios y el incremento del metabolismo en estos embriones, el cual se refleja en un aumento en las tasas de consumo de O_2 y de producción de CO_2.

Se han detectado anomalías cromosómicas (principalmente aneuploidías) en varios estadios celulares de los embriones obtenidos in vitro, desde el oocito hasta el blastocisto, las cuales son responsables de la fertilización y el clivaje anormal, y de la mortalidad embrionaria (Iwasaki y col., 1992; King, 1991a). La incidencia de anomalías cromosómicas dentro de los embriones obtenidos in vivo está estimada en un rango de 2 a 17%, mientras que entre los embriones obtenidos in vitro estas superan ampliamente el 50% (McCauley y col., 2003). Por otra parte, en un estudio reciente se ha mostrado que los embriones de equinos, porcinos, ovinos, caprinos y bovinos obtenidos in vitro presentaron una mayor incidencia en la tasa de apoptosis en comparación con su contraparte obtenidos in vivo (Rubio Pomar y col., 2005).

En cuanto a las diferencias bioquímicas entre ambos tipos de embriones, el conocimiento actual es limitado. Un evento importante en el período del clivaje es la transición del control materno del desarrollo al control por parte del embrión, también llamado activación del genoma embrionario. Esto ocurre en el estadio de 8 células (Barnes y First, 1991; Camous y col., 1986; King y col., 1989; Plante y col., 1994). En esta fase del desarrollo el embrión es vulnerable a factores adversos, y corresponde a un bloqueo in vitro cuando las condiciones de cultivo son inadecuadas (Holm y col., 1999; Khurana y Niemann, 2000). La activación del genoma embrionario es importante debido a que deben comenzar a expresarse apropiadamente los genes involucrados en el clivaje, la compactación y la formación del blastocisto.

Varios estudios han caracterizado el metabolismo energético del embrión bovino producido in vitro (Khurana, 1992; Rieger, 1992; Rieger y col., 1992). Desde la maduración del oocito hasta el estadio de 12 células, el metabolismo fue constate, teniendo al piruvato como substrato preferido. Durante la compactación y la formación del blastocele, la oxidación de lactato y piruvato fue creciendo 3 a 4 veces. De todos los parámetros metabólicos, el más consistente fue la captación de substratos. La captación de glucosa se incrementó constantemente hasta el estadio de blastocisto. El rasgo más saliente del metabolismo de la glucosa en los embriones in vitro fue una alta tasa de glucólisis aeróbica, comparada a la de su contraparte in vivo. La tasa máxima de oxidación de glucosa para los embriones in vitro fue alcanzada en el estadio de mórula, mientras que entre los embriones obtenidos in vivo fue en el estadio de blastocisto. El metabolismo de la glutamina en los estadios tempranos es relativamente alto comparado con el de las mórulas y blastocistos, sugiriendo que la composición del medio de cultivo es importante y debe ser ajustada apropiadamente a los cambios de metabolismo relacionados con el embrión. Es claro también que el metabolismo de los embriones depende del sistema de cultivo y el medio usado (Rieger y col., 1994).

Otra diferencia notable entre los dos tipos de embriones se observa en la densidad de flotación. Los embriones obtenidos in vivo se hunden en una solución de sacarosa 2,35 M (peso específico = 1,301 g/ml), en contraste los embriones obtenidos in vitro flotan en soluciones de sacarosa 1,6 M (Leibo y Loskutoff, 1993). La menor densidad de los embriones obtenidos in vitro es el resultado de una proporción lípidos:proteínas más elevada.

Por último, pese a que la zona pelúcida de los embriones obtenidos in vitro es disuelta más fácilmente por enzimas, muestra más resistencia a la ruptura cuando el embrión debe eclosionar en cultivo comparada con la zona pelúcida de los embriones obtenidos in vivo. Tal diferencia altera la permeabilidad de la zona pelúcida al agua y a los crioprotectores.

Estas dos últimas diferencias condicionan el efecto de la criopreservación sobre ambos tipos de embriones.

Evaluación de embriones

Para alcanzar tasas de preñez óptimas en la actividad de transferencia embrionaria es esencial disponer de información sobre el desarrollo cronológico y morfológico del embrión. La primera descripción fue realizada por Hartman y col. (1931), luego numerosos grupos de investigación aportaron conocimiento sobre el tema. Con el correr de los años han sido reportados numerosos métodos para evaluar la normalidad y la viabilidad de los estadios tempranos de los embriones. Muchos de esos métodos se han centrado en los aspectos morfológicos del embrión, tales como la uniformidad de sus células, la forma del embrión, su color y sus dimensiones.

Cuando se evalúan visualmente los embriones bovinos se consideran principalmente dos factores: Su apariencia general, observando aspectos tales como la presencia de células irregulares o degeneradas y el estadio de desarrollo del embrión en relación con su edad estimada.

El sistema de clasificación de embriones más utilizado en la actualidad es el que desarrollaron Lindner y Wright (1983) para embriones bovinos sobre la base de la morfología. Este sistema ha tenido gran aceptación y es utilizado con pequeñas variaciones en otras especies tales como ovinos, caprinos, equinos y porcinos, ya que ha demostrado correlación con las tasas de preñez (Hasler y col., 1987; Lindner y Wright, 1983). Los autores clasificaron los embriones en 5 categorías: Excelente, bueno, regular, malo y degenerado (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de embriones bovinos de acuerdo a su morfología (Lindner y Wright, 1983).

Grado	Calidad	Características típicas del embrión
1	Excelente	Embrión perfectamente simétrico, con escasa granulación, contorno bien definido; sin blastómeras extruídas. Debe estar en el estadio de desarrollo esperado para su edad.
2	Bueno	Embrión algo granulado, con contorno bien definido; con alguna extrusión de blastómeras, y un grado mínimo de degeneración. Ocasionalmente el contorno es algo asimétrico.
3	Regular	Embrión intacto pero de contorno irregular; defectos aparentes obvios tales como células extruídas, vesícula y algunas blastómeras degeneradas.
4	Malo	Embriones muy granulados y con contorno irregular; muchas blastómeras extruídas y degeneración evidente.
5	Degenerado	Degeneración tan pronunciada que es imposible determinar el estadio exacto de desarrollo.

1.2. LA CRIOPRESERVACIÓN

1.2.1. Generalidades

La esencia de la criobiología es el estudio de los profundos cambios físicos y químicos que sufren las células o los sistemas celulares cuando son expuestos a temperaturas inferiores a los 0ºC. Este evento induce la formación de hielo intra y extracelular, lo cual provoca una respuesta principalmente física por parte de las células.

El agua líquida juega un rol fundamental en la estructura y función de los sistemas vivos, y el cambio más obvio que se produce en el proceso de congelamiento es que la cantidad de líquido va reduciéndose progresivamente y eventualmente desaparece. Los cambios en la proporción de agua líquida ejercen una fuerte influencia sobre la estructura de las macromoléculas celulares, y a través de ellas sobre le estructura celular en si. Pero, aún si las interacciones agua $\rightarrow$ macromoléculas $\rightarrow$ estructura celular no fueran afectadas por el congelamiento, la simple reducción en la concentración de agua líquida introduce un gran desequilibrio osmótico al cual las células deben responder.

La ciencia de la criobiología vio sus comienzos poco después de la Segunda Guerra Mundial, hasta entonces, la investigación sobre los eventos que acontecían a temperaturas por debajo de los 0ºC eran dominio de la física.

Muchos de los primeros investigadores eran biólogos o médicos que no tenían conocimientos sobre física. En esas circunstancias las primeras publicaciones sobre biología de las bajas temperaturas fueron sólo descriptivos. Tal es el caso del trabajo "Life, and Death at Low Temperatures" publicado en 1940 por Basil Luyet (Luyet y Gehenio, 1940), quien es considerado el padre de la criobiología. En ese trabajo Luyet mostró un punto de vista sobre la vitrificación sorprendentemente similar al contemporáneo, viendo en ella el Santo Grial de la criobiología.

Pero el desarrollo que dio el verdadero impulso a la criobiología fue la criopreservación de espermatozoides empleando glicerol reportada en 1949 por Polge (Polge y col., 1949) y, un año más tarde, la confirmación realizada por Smith (Smith, 1950) sobre la efectividad del glicerol para congelar glóbulos rojos. Ambos descubrimientos fueron empíricos, ya que en ese entonces se desconocía la naturaleza de los daños causados por el congelamiento.

Muchos logros importantes alcanzados en años siguientes se basaron en los protocolos y las técnicas pioneras desarrolladas por Polge y sus colabores en la década de los años 50. Aún en años recientes se han realizados avances trascendentales que han transformado todos los campos de la criobiología y que

han sido inspirados, por lo menos filosóficamente, en los trabajos de Polge. Entre ellos se pueden mencionar el desarrollo del congelamiento de plaquetas empleando trealosa (Wolkers y col., 2001), y la vitrificación de tejido meristemático de plantas tropicales tales como la banana (Thinh y col., 1999).

El descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del dimetil sulfóxido fue el primer desarrollo basado en una predicción racional (Lovelock y Bishop, 1959). Mientras que Peter Mazur fue el primero que empleó la matemática y la física en el campo de la criobiología, aplicando métodos rigurosos para reemplazar la larga lista de trabajos experimentales sin control y plagados de registros de anécdotas realizados desde los comienzos. Sus trabajos han estimulado el entendimiento de los daños provocados por el congelamiento.

La hipótesis de los dos factores propuesta por Mazur (1965), el daño mecánico provocado por el hielo intracelular durante el congelamiento rápido y el daño provocado por la deshidratación que se produce a partir del hielo extracelular durante el congelamiento lento, fue un hito, aunque los mecanismos precisos del daño producido por el congelamiento lento aún se desconocían.

Los recientes estudios realizados por Crowe y col. (2001) sobre la deshidratación de las membranas han permitido comprender el rol de la deshidratación y el grado de tolerancia que células y tejidos presentan a este factor durante el congelamiento. La desnaturalización de la proteínas por el frío fue predicho inicialmente por Brandts (1964) y posteriormente fue confirmado por Tsonev y Hirsh (2000). Pero, pese a que todos estos conceptos están involucrados en el daño provocado por el congelamiento, y que podemos ver que este es un proceso complejo, en realidad no se han hecho grandes esfuerzos en los últimos 40 años para terminar de armar este complejo rompecabezas de eventos biológicos a bajas temperaturas.

Un cambio profundo que se produjo en las últimas décadas ha sido la tendencia a reemplazar la investigación en criobiología básica por estudios de criobiología aplicada. Lo cual ha llevado a una profusión de trabajos científicos de aplicación

práctica provocando un lento avance en el descubrimiento de los eventos biofísicos ligados a la criopreservación de células y tejidos (Meryman, 2004).

1.2.2. Principios de criobiología

Sea cual fuere el método empleado la criopreservación involucra la exposición inicial de las muestras al crioprotector, el congelamiento a temperaturas por debajo de cero, el almacenamiento, el descongelamiento, y finalmente, la remoción del crioprotector, con el retorno al ambiente fisiológico, lo que permitirá el desarrollo posterior. La condición fundamental es que las células mantengan su integridad estructural a lo largo de todo el procedimiento.

El principio más importante de la criobiología es reducir el daño causado por la formación intracelular de hielo. Esto se consigue mediante la deshidratación de la célula antes o durante el proceso de criopreservación. Si la deshidratación es inadecuada, se formarán grandes cristales intracelulares, los cuales dañarán la célula en forma irreversible.

Otros factores que influyen en el éxito del proceso de criopreservación incluyen la especie, el estado de desarrollo, el crioprotector y el método de criopreservación.

Congelamiento lento de embriones

Durante muchos años fue imposible congelar con éxito los embriones de mamífero, ya que su gran tamaño impedía que los diferentes procedimientos de congelamiento pudieran evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, los cuales resultaban letales. El éxito se alcanzó gracias a que se lograron comprender algunos puntos claves:

a- La diferencia entre las tasas de enfriamiento y calentamiento lentas (<1ºC/min) y rápidas.

b- Los efectos de la inducción de la nucleación ("seeding") a temperaturas por debajo de 0°C.

c- El rol de los crioprotectores.

d- Las formas de incorporar y remover el crioprotector.

Para cada tipo celular, hay una tasa de enfriamiento óptima. La tasa máxima de enfriamiento para diferentes células podría variar en muchos ordenes de magnitud (Ashwood-Smith y Farrant, 1980; Elliot y Whelan, 1977; Friedler y col., 1988). Por ejemplo, la velocidad de enfriamiento con la que se alcanza la tasa óptima de sobrevida para los oocitos de ratón es alrededor de 2000 veces menor que para los glóbulos rojos humanos. Se han desarrollado algunos modelos matemáticos para explicar y/o predecir las tasas de enfriamiento óptimas (Jackowski y col., 1980; Leibo y col., 1978; Leibo, 1980; Mazur y col., 1984). Estos modelos han sido particularmente exitosos con embriones de ratón.

La tasa de difusión de agua a través de la membrana celular es el factor limitante más importante en los procedimientos de congelamiento lento, y esto depende de:

a- La composición y permeabilidad características de la membrana celular.

b- La razón superficie/volumen de la célula.

c- La temperatura.

d- La diferencia de presión osmótica a ambos lados de la membrana celular.

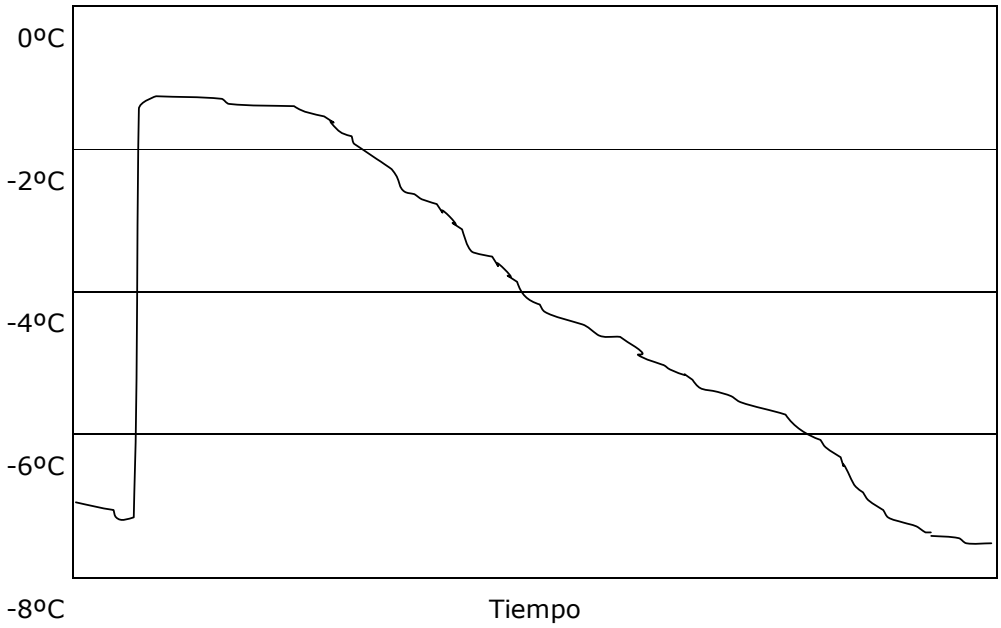
Estos son los factores a tomar en cuenta durante los procesos de deshidratación y rehidratación celular (Jackowski y col., 1980; Leibo, 1980). Las células que son enfriadas en forma extremadamente lenta no sobreviven tan bien debido al llamado "efecto solución", causado por la exposición prolongada de la célula a altas concentraciones de sales y otros solutos de su medio interno (Ashwood-Smith y Farrant, 1980; Elliot y Whelan, 1977).

Pese a que existen algunos tipos celulares para los que no es necesaria la inducción manual de la formación de hielo en la solución externa ("seeding"), cuando las células son de gran tamaño en muy importante realizar este proceso para obtener buenas tasas de sobrevida. De esta forma se evita el supercongelamiento y comienza el proceso de deshidratación.

En la Figura 1 se ilustran los cambios de temperatura observados durante el congelamiento de una solución acuosa. El agua y la solución acuosa tienen una tendencia a congelar por debajo de su temperatura de fusión después de que ocurre la nucleación del hielo: este fenómeno es conocido como supercongelamiento. Por ejemplo, mientras la temperatura de fusión del hielo es 0ºC, la temperatura del agua puede ser reducida significativamente por debajo de 0ºC después de la formación de hielo, y en condiciones cuidadosamente controladas el agua puede ser congelada a aproximadamente –40ºC.

Esta propiedad es importante para el congelamiento de embriones porque la formación de hielo está asociada con un ascenso en la temperatura cuando es liberado el calor latente de fusión, y debido a la formación de hielo el agua es removida tanto desde la solución como desde el embrión. Cuando se inicia la formación de hielo a altas temperaturas subcero, el hielo se difunde lentamente a través de la solución, y se produce una pequeña liberación de calor latente. Esto no daña al embrión. Cuando la formación de hielo ocurre en una solución profundamente supercongelada, sin embargo, el hielo se propaga muy rápidamente a través de la solución. Esto es perjudicial para el embrión debido a que queda completamente hidratado cuando comienza la formación de hielo, incrementando la probabilidad de que se forme hielo intracelular. Además, habría un aumento de temperatura significativo dentro de la solución que alterará la tasa de congelamiento.

Fig. 1 – Cambios de temperatura durante el congelamiento de una solución acuosa (de Elder y Dale, 2000)

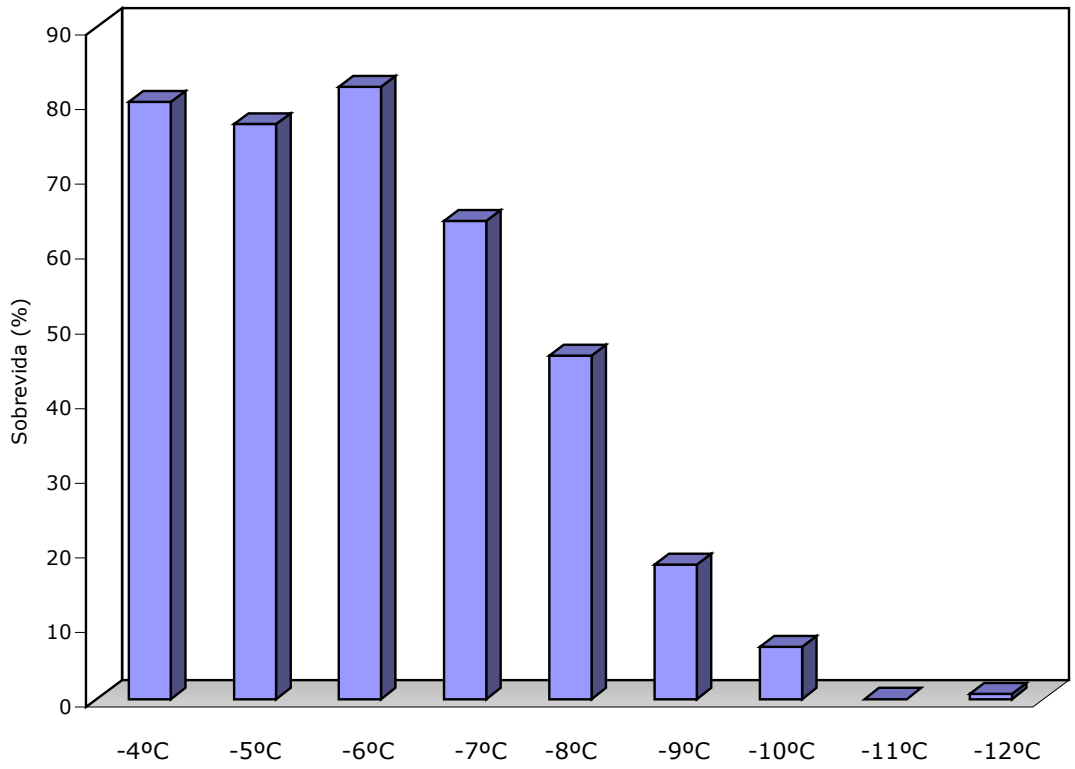


La formación controlada de hielo es un factor clave que determina la viabilidad de los embriones luego del congelamiento y descongelamiento (Whittingham, 1977). En una serie de experimentos se observó que las muestras donde se indujo la nucleación por debajo de los –9ºC tuvieron baja viabilidad, mientras que si el proceso se realizaba a temperaturas más altas (-5 a –7,5ºC) dieron como resultado una viabilidad mucho más elevada (Figura 2).

Un análisis del comportamiento de la nucleación espontánea de las soluciones demostró que si la inducción no se realiza en forma controlada la viabilidad posterior de los embriones es muy baja debido al daño que experimentaban. La base física de ese daño se explica claramente cuando se examina la historia térmica de las soluciones superenfriadas. La práctica normal es enfriar la solución hasta temperaturas alrededor de –7ºC, mantener esta temperatura constante hasta el equilibrio, y entonces inducir la formación de hielo. La temperatura se eleva hasta el punto de fusión de la solución, y una vez formado el hielo retorna a los –7ºC a una velocidad de 2,5ºC/min. Entonces se produce la

deshidratación celular durante el enfriamiento lento subsiguiente. En contraste, en una solución sobreenfriada a –15ºC luego de la elevación de la temperatura resultante de la formación de hielo, se produce un rápido descenso a razón de 10ºC/min hasta los –15ºC. La combinación de la rápida tasa de enfriamiento y la gran reducción de la temperatura impiden la deshidratación celular, por lo que la formación de hielo intracelular es inevitable.

Fig. 2 - Sobrevida de embriones de ratón luego del seeding a diferentes temperaturas (de Whittingham, 1977)



Para la mayoría de los protocolos de congelamiento lento, la formación de hielo es iniciada manualmente a temperaturas cercanas al supercongelamiento (por ejemplo –5 a – 7ºC). El procedimiento usual es provocar que una pequeña porción de la solución se enfríe aun más, por ejemplo, tocando la pared del

contenedor con un objeto enfriado a –196ºC ("seeding"). Después de realizar el "seeding" en un punto, el hielo difunde a través de toda la solución.

Cuando se induce la nucleación en las soluciones a –5 a –7ºC, los cristales de hielo no difunden dentro de la célula del embrión debido a la osmolaridad marginalmente más alta de su ambiente intracelular. Luego del "seeding", la concentración de los solutos en la fracción no congelada se incrementa en la medida que el agua es incorporada a los cristales de hielo extracelulares. El incremento de la concentración de solutos extracelulares genera un gradiente osmótico a través de la membrana celular, la cual remueve agua de la célula causando la deshidratación celular.

Si el congelamiento se produce en forma suficientemente lenta, casi toda el agua disponible puede ser removida desde el interior de la célula, dando como resultado que la célula no sea dañada cuando es colocada en nitrógeno líquido. Aunque esto evita la formación de hielo intracelular, la deshidratación severa puede ser perjudicial, especialmente si las células son descongeladas rápidamente. Entonces, en la práctica, el proceso de deshidratación es detenido antes de ese punto, y el congelamiento intracelular es inducido mediante la inmersión del contenedor directamente en nitrógeno líquido. Bajo esas condiciones, se forman pequeños cristales de hielo no dañinos. La temperatura de inmersión en nitrógeno líquido usualmente es entre –30 y –80ºC, y depende de un número de factores, especialmente las ya nombradas tasas de descongelamiento.

La velocidad de calentamiento es crítica para el éxito de los procedimientos de congelamiento lento, debido a que determina la velocidad de crecimiento de los cristales. Las velocidades óptimas de calentamiento, dependen del tipo celular congelado y de la cantidad de agua dentro de la célula en el momento del congelamiento intracelular (Ashwood-Smith y Farrant, 1980; Elliot y Whelan, 1977). Si queda una pequeña cantidad de agua intracelular cuando se realiza la inmersión en nitrógeno líquido, pueden formarse pequeños cristales. Bajo esas circunstancias, son esenciales velocidades de descongelamiento rápido, ya que si son lentas dan tiempo a los pequeños cristales para crecer y transformarse en

cristales más grandes que pueden dañar a la célula. Este proceso es conocido como recristalización.

Si las células son enfriadas lentamente hasta deshidratarlas prácticamente por completo antes de ser sumergidas en nitrógeno líquido, la recristalización no ocurre o es muy limitada aun si el calentamiento es lento. Sin embargo, esas células podrían, ser dañadas por el calentamiento rápido debido a los rápidos cambios en la osmolaridad dentro de las células deshidratadas. Como el calentamiento lento da más tiempo a las células para rehidratarse, es un método más apropiado para las células que han sufrido una deshidratación severa. Entonces, la velocidad óptima de calentamiento depende inevitablemente del procedimiento de enfriamiento.

El rol de los crioprotectores es proteger a la célula de la formación de cristales y de la alta concentración de solutos (Ashwood-Smith y Farrant, 1980; Elliot y Whelan, 1977). Los crioprotectores pueden ser divididos en dos grupos: Permeables (aquellos que ingresan al interior de la célula) y no permeables (los que no ingresan). Ejemplos de los crioprotectores permeables son el glicerol, DMSO, etilenglicol, propilenglicol, todos con peso molecular inferior a 100. Los componentes que debido a su tamaño o polaridad quedan en la solución extracelular incluyen azúcares de gran peso molecular como la sacarosa, Ficoll y rafinosa, así como proteínas y lipoproteínas. Frecuentemente, la yema de huevo, la leche, y el suero sanguíneo son usados en combinación con otros crioprotectores ya que ellos contienen tales moléculas (Kasai y col., 1981).

El modo de acción de los crioprotectores es complejo. La adición de un crioprotector causa un leve descenso del punto de congelamiento de la solución, pero a las concentraciones usadas en los procedimientos de congelamiento lento, el punto de congelamiento sólo desciende entre 2 y 3ºC. Su efecto protector se debe más a sus propiedades coligativas, o sea, la capacidad del crioprotector de unirse al agua y su habilidad para reducir el efecto tóxico de las altas concentraciones de otros componentes (Fahy, 1989). La mayoría de los crioprotectores permeables son muy solubles al agua y son capaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua.

Por otro lado cuando la célula está muy deshidratada y está rodeada de sales muy concentradas, los crioprotectores reducen el daño durante el congelamiento y descongelamiento porque simplemente incrementan el volumen de la fase residual no congelada. Esto reduce la composición iónica de la solución a cualquier temperatura por debajo de 0ºC. Además se debe tener en cuenta que todos los demás parámetros de la solución como viscosidad, contenido de gases y pH cambian luego de la formación de hielo.

Para los procedimientos de congelamiento lento, las concentraciones de crioprotector se encuentran generalmente alrededor de 1,5 M. Los crioprotectores penetran fácilmente en la célula por ósmosis, pero el agua sale de ella en forma aun más fácil, lo cual puede acarrear ciertos problemas. Las células colocadas en una solución crioprotectora se contraen debido a la rápida salida del agua favorecidas por la alta concentración extracelular de solutos. Sin embargo, como el crioprotector entra a la célula, se restablece un equilibrio y la célula retornará a su tamaño original.

Un problema aun mayor se produce cuando se necesita remover el crioprotector permeable. Cuando la célula es colocada en una solución con una concentración de crioprotector menor a la intracelular, el agua extracelular entra a la célula más rápido de lo que el crioprotector logra salir de ella. Esto causa que la célula aumente su volumen o que estalle. Este problema puede ser reducido removiendo el crioprotector en una serie de pasos de concentración decreciente (por ejemplo 1,5, 1,0, 0,5, 0,25 M). Eso no evita el aumento de volumen de la célula pero si reduce la magnitud de ese aumento. Cuando la célula ha recuperado su tamaño normal en una solución (o sea se ha equilibrado) debe ser colocada en la solución siguiente (comúnmente 3 a 10 min por paso).

La alternativa que actualmente se usa en todas las soluciones de remoción del crioprotector es el agregado de altas concentraciones de una sacarosa. Esta molécula no permeable produce un contrabalance de la alta concentración de crioprotector en el interior de la célula, lo cual reduce la diferencia de osmolaridad entre el medio interno y externo. El uso de altas concentraciones de sacarosa permite usualmente remover el crioprotector en un paso; lo que hace a

este procedimiento más rápido y simple que los procedimientos en los que se remueve el crioprotector en varios pasos sólo por dilución (Niemann, 1991).

Tomando en cuenta este efecto se ha desarrollado una variante, el método de congelamiento para transferencia directa ("one-step"), el cual consiste en congelar los embriones en un medio hipertónico conteniendo un soluto no permeable, tal como la sacarosa (Leibo, 1984). Al realizar el descongelamiento el crioprotector intracelular difunde rápidamente fuera del embrión para mantener el equilibrio osmótico. De esa forma, los embriones pueden ser directamente transferido a una receptora. Desde un punto de vista práctico, el método de congelamiento para transferencia directa elimina la necesidad de la presencia de un embriólogo durante la transferencia embrionaria. Por ello, un inseminador experimentado, con el entrenamiento apropiado, puede llevar a cabo correctamente las transferencias. Esto colocaría a la transferencia embrionaria en el mismo nivel de complejidad que la inseminación con semen congelado (Voelkel y Hu, 1992).

Vitrificación de embriones

Hace casi 70 años Luyet (1937) utilizó por primera vez la vitrificación, preservando esperma de rana. En años posteriores este método se empleó con eritrocitos, tejidos y órganos. Pero recién en 1985 se logró desarrollar la primera solución de vitrificación con la que se pudo criopreservar embriones con éxito (Rall y Fahy, 1985).

La vitrificación puede ser definida como un proceso físico por el cual una solución altamente concentrada solidifica durante el enfriamiento sin la formación de hielo. Este sólido retiene la distribución molecular y iónica normales del estado líquido y puede ser considerado como un líquido supercongelado extremadamente viscoso (Fahy y col., 1984; Fahy, 1989; Mazur, 1990; Rall, 1987; Rall y Fahy, 1985).

Las soluciones de vitrificación tienen tres características comunes:

- La solución de criopreservación debe contener una alta concentración de uno o más crioprotectores permeables.
- Cada solución requiere de un componente salino fisiológico.
- Se deben agregar macromoléculas para incrementar la capacidad de la solución de supercongelar y vitrificar.

Mientras que el congelamiento lento es realizado empleando bajas concentraciones de crioprotector y bajas tasas de enfriamiento, los procedimientos de vitrificación usan muy altas concentraciones de crioprotector y altas velocidades de enfriamiento, lo cual provoca que la solución pase al estado vítreo. En este estado se forma una fase sólida similar al vidrio en lugar de los cristales de hielo formados en el congelamiento (Fahy, 1989; Kasai y col., 1981).

La vitrificación tiene ciertas ventajas sobre el congelamiento ya que evita el daño causado por la formación intracelular de hielo y los efectos osmóticos causados por la formación extracelular de hielo. La teoría sobre esta técnica como método de criopreservación ha sido descripta en varios trabajos (Fahy, 1989; Mazur, 1990; Rall, 1987).

Una solución de vitrificación consiste de uno o más crioprotectores en concentraciones de alrededor de 40% (v/v). La solución original, que consistía de un 20,5% de DMSO, 15,5% de acetamida, 10% de propilenglicol y 6% de etilenglicol, permitió la criopreservación exitosa de embriones de ratón de 8 células (Rall y Fahy, 1985). Sin embargo, esta solución a temperatura ambiente es tóxica para las células, por ello los embriones deben ser expuestos a la concentración final de la solución a bajas temperaturas (0 a 4ºC). La revisión de la composición original de esta solución ha reducido su toxicidad y ha hecho a este método un poco más fácil de usar (Kasai y col., 1990).

Como se dijo anteriormente, en la composición de una solución de vitrificación hay altas concentración de crioprotectores y aditivos. Los aditivos cumplen varias

funciones; las grandes concentraciones de moléculas no permeables tales como sacarosa, Ficoll y polietilenglicol reducen el contenido de agua de la célula, y la acetamida se adiciona con el objetivo de reducir la toxicidad de agentes crioprotectores tales como el DMSO. Las altas concentraciones de crioprotectores permeables causan en si mismo la deshidratación intracelular, ya que su entrada a la célula es más lenta que la salida de agua desde el interior. Las altas concentraciones de crioprotector son potencialmente tóxicas para la célula, particularmente a altas temperaturas. Una disminución de la temperatura de exposición de las células a valores cercanos a 0ºC, disminuye el efecto tóxico y hace más lenta la difusión del crioprotector a través de la membrana celular. Mediante una cuidadosa selección de la duración de la exposición a la solución de crioprotección, de la composición del crioprotector, o ajustando la temperatura de exposición, es posible identificar la "ventana" de menor toxicidad, la cual aumentará la sobrevida de la célula que ha sido criopreservada.

1.2.3. Aplicaciones de la criopreservación de embriones

Los primeros intentos de congelar embriones de mamíferos no fueron exitosos (Green y col., 1956; Parrott, 1960). Recién en 1972 se logró el primer congelamiento exitoso empleando embriones de ratón (Whittingham y col., 1972; Wilmut, 1972). Para ello se realizó un descenso lento de la temperatura (1ºC/min o menos) hasta una temperatura muy baja (alrededor de –80ºC) antes de colocar los embriones en nitrógeno líquido, por lo que el tiempo que llevaba completar el proceso era muy largo. Los embriones necesitaban ser descongelados lentamente y el crioprotector debía ser adicionado y removido en varios pasos.

En la actualidad se han obtenido descendientes de 22 especies a partir de la transferencia de embriones criopreservados (Rall, 2001). También han nacido cientos de niños luego de emplear gametas y embriones humanos criopreservados. Para esto los protocolos de congelamiento lento han sido simplificados, y se necesita menos tiempo para completarlos (Friedler y col.,

1988; Mazur, 1990, Whittingham, y col., 1979; Willadsen, 1977). Más aún se han desarrollado una serie de protocolos de congelamiento rápido o vitrificación, en los que los embriones pueden ser sumergidos directamente en el nitrógeno líquido luego de la deshidratación empleando soluciones de crioprotección altamente concentradas (Biery y col., 1986; Bongso y col., 1988; Miyamoto e Ishibashi, 1986; Rall y col., 1987; Rall, 1987; Reinthaller y col., 1988; Shaw y col., 1991a; Shaw y col., 1991b; Szell y Shelton, 1986; Szell y Shelton, 1987; Takahashi y Kanagawa, 1990; Trounson y col., 1987; Trounson y col., 1988; Trounson, 1990; Van der Auwera y col., 1990; Wilson y Quinn, 1989).

La criopreservación de embriones se ha incorporado como un procedimiento de rutina en los sistemas de producción de especies de interés agropecuario (Friedler y col., 1988; Leibo, 1989; Schneider y Mazur 1990). El desarrollo de una técnica eficiente para la criopreservación de estos embriones ha sido un paso fundamental para su explotación comercial. En la actualidad ya se han criopreservado con diferente grado de éxito embriones de especies tales como bovinos, ovinos, equinos, caprinos y porcinos. Considerados en conjunto, han nacidos miles de descendientes de esas especies a partir de embriones congelados.

Los estudios sobre la criobiología de este tipo de embriones han sido estimulados por diferentes objetivos. El uso de embriones criopreservados permite (Leibo 1989; Seidel, 1991, Wilmut y col., 2000):

1. Conservar los embriones por largo tiempo cuando su número excede el de las receptoras disponibles o cuando los nacimientos deben ser diferidos en el tiempo.

2. Los embriones congelados puedan ser empleados en forma similar al semen congelado, permitiendo que pueda controlarse el período de pariciones, optimizando de esa forma el manejo de los vientres. Más aun el desarrollo de un método de congelamiento y transferencia directa de embriones elimina la necesidad contar un embriólogo durante el procedimiento, ya que un

inseminador experimentado, con el entrenamiento apropiado, puede llevar a cabo correctamente las transferencias en un establecimiento.

3. Los embriones criopreservados puedan ser enviados de un lugar a otro fácilmente. Además, se los puede mantener en almacenamiento mientras se evalúa el estado sanitario de sus padres. Existe gran cantidad de evidencia que avala el empleo de la transferencia de embriones congelados para evitar la dispersión de enfermedades normalmente asociadas con el movimiento de animales vivos de un país a otro (Stringfellow y Givens, 2000).

4. La micromanipulación de embriones y la transferencia de genes han comenzado a usarse en forma comercial, la criopreservación de estos embriones permite que se realicen evaluaciones sobre otros embriones hermanos.

5. El establecimiento de bancos con genética de razas en peligro de extinción. Con el objetivo de incrementar la productividad, en algunos países en desarrollo, se emplean razas exóticas para realizar cruzamientos, conminando a las razas indígenas a la extinción. Una forma de preservar la diversidad es crear bancos de semen y embriones congelados de razas locales en peligro de extinción (Gordon, 1997).

2. OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

Contar con una técnica de criopreservación práctica y eficiente es fundamental para la difusión de la transferencia de embriones. Desde el año 1973 en que se logró el nacimiento del primer ternero producido a partir de un embrión congelado (Wilmut y Rowson, 1973), han sido reportados muchas técnicas y protocolos de criopreservación de embriones de animales de interés agropecuario. La investigación ha sido enfocada principalmente sobre embriones bovinos, mientras que la criopreservación de los embriones de otras especies tales como ovinos, porcinos, equinos y caprinos es menos abundante (Massip y col., 2004).

Las tasas de éxito del congelamiento de embriones pueden aumentarse a través de dos abordajes:

- Producir embriones de mejor calidad que puedan resistir mejor las condiciones extremas a las que son sometidos en los procesos de criopreservación. Para ello se ha tratado de mejorar el sistema de obtención y transferencia de los embriones obtenidos in vivo y se ha tratado de mejorar los sistemas de cultivo para los embriones obtenidos in vitro (Greve y col., 1993; Massip y col., 1995).

- Adaptar las técnicas de criopreservación estándar al tipo de embrión a criopreservar (Gordon, 1996, Massip y col., 1995; Vajta, 1997). Este es el objetivo general del presente trabajo. Para lograr esto se han realizado diferentes evaluaciones y comparaciones.

Se evaluó la incorporación y remoción de crioprotectores en las células con el objetivo de estudiar la habilidad de estos para atravesar la membrana plasmática durante el proceso de criopreservación. Para ello se han empleado: glicerol, etilenglicol y propilenglicol.

Se estudió el efecto de la sacarosa en los medios de incorporación y remoción de los crioprotectores. Se analizaron protocolos de transferencia directa de embriones.

Se evaluó el efecto que tiene el congelamiento sobre embriones de distinto origen: Obtenidos in vivo y obtenidos in vitro.

Se comparó el comportamiento de diferentes protocolos de congelamiento lento y vitrificación realizando modificaciones, en la búsqueda de lograr la mayor eficiencia en la criopreservación de embriones de bovinos y ovinos.

Para llevar a cabo todos estos estudios se realizaron evaluaciones in vitro, cultivando los embriones luego de la criopreservación, y evaluaciones in vivo a través de transferencias.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. DROGAS Y REACTIVOS

Las drogas, hormonas, reactivos y otros productos empleados en los diferentes experimentos fueron obtenidos de los siguientes proveedores:

- 17 beta estradiol: Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina
- Aceite mineral: Laboratorios Pharmos, Buenos Aires, Argentina
- Acetato de medroxiprogesterona: Laboratorios Gador, Buenos Aires, Argentina
- Antibiótico antimicótico (AA) y solución buffer fosfato salina de Dulbecco (DPBS): Gibco, Grand Island, NY, EUA.
- Dispositivo intravaginal de progesterona (Easy Breed - CIDR): InterAg, Hamilton, New Zealand.
- FSH (Folltropin-V): Vetrepharm Inc, London, ON, Canada
- FSH porcina (pFSH) y Cloprostenol – Estrumate: Schering Laboratories, Omaha, NE, EUA
- GnRH (Receptal) Laboratorie Hoechst, Munich, Alemania.
- Gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG): Laboratorios Syntex, Buenos Aires, Argentina
- LH ovina purificada Immuno Chemical Products, Auckland, New Zealand.

El resto de los productos utilizados para la preparación de medios y soluciones fue obtenido de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA.

En todos los casos se utilizó agua ultrapurificada mediante un filtro NanoPure (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA).

3.2. OBTENCIÓN DE EMBRIONES

3.2.1. Producción de embriones bovinos obtenidos in vivo

Superovulación e inseminación de las donantes

Como donantes de embriones se emplearon vacas Hereford adultas (edad: 4 a 8 años; peso corporal promedio ± DS: 574 ± 40 kg). Las donantes fueron divididos en grupos de 4 animales. En cada grupo, el estro fue sincronizado por medio de un dispositivo intravaginal (CIDR) conteniendo 1,9 g de progesterona (se consideró Día 0 el día de la inserción del CIDR) y 5 mg de 17-β estradiol, i.m. 12 h después de la inserción del CIDR.

El tratamiento de superestimulación fue iniciado el Día 4 utilizando FSH (Folltropin-V) reconstituida según las indicaciones del proveedor y de acuerdo al siguiente esquema:

Día 4: 2,5 ml por la mañana, 2 ml 12 h después.

Día 5: 2 ml por la mañana, 1,5 ml 12 h después.

Día 6: 1,5 ml por la mañana, 1 ml 12 h después.

Día 7: 1 ml por la mañana, 0,5 ml 12 h después.

En el Día 6, las donantes recibieron también 2 ml de Cloprostenol (análogo de prostaglandina F2alfa), i.m., y el CIDR fue retirado en la tarde del mismo día. El Día 8, se administraron 2,5 ml de GnRH (Receptal), i.m. En la mañana y la tarde de los Días 7, 8 y 9 se realizó la detección de celo durante 30 min por

observación de la conducta de monta. Aquellos animales que mostraron celo recibieron inseminación artificial 12 h después.

Recolección y evaluación de los embriones

Los embriones fueron recolectados en forma no quirúrgica seis días después de la detección del celo. Para este propósito, fueron lavados ambos cuernos uterinos con DPBS combinado con 1% de SFB y 1% de AA. Los embriones fueron buscados bajo lupa e inmediatamente colocados en medio de mantenimiento, consistente en DPBS combinado con 10% de SFB y 1% de AA.

Los embriones fueron clasificados de acuerdo a su estadio de desarrollo y su morfología (Lindner y Wright, 1984). Solo fueron empleados en los experimentos aquellas mórulas compactas o blastocistos de calidad buena o excelente (ver capítulo 1.1.3.4). Los embriones recolectados cada día (usualmente 20 a 30) fueron asignados aleatoriamente a los diferentes tratamientos dentro de cada experimento.

3.2.2. Producción de embriones bovinos obtenidos in vitro

Aspiración folicular de las donantes

Como donantes de oocitos se emplearon vacas Hereford adultas (edad: 4 a 8 años; peso corporal promedio ± DS: 574 ± 40 kg). La punción de los folículos se realizó empleando una aguja de 18 G x 45 cm conectada a una bomba de vacío. La aspiración fue guiada mediante un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokyo, Japan) con un transductor linear de 7,5 MHz (Bols y col., 1995a).

Como medio para la aspiración de los oocitos se empleó TCM 199 combinado con 0,05 mg/ml de heparina, 100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 0,05 mg/ml de kanamicina, y 0,5% de BSA-FAF.

Maduración in vitro

Una vez extraídos del líquido de aspiración bajo lupa, los oocitos fueron transferidos al medio de mantenimiento compuesto por TCM 199 combinado con HEPES 15 mM (empleado como buffer) y 10% de SFB. Para la maduración in vitro (IVM) los oocitos fueron lavados dos veces en medio de mantenimiento y dos veces en un medio compuesto por TCM 199-bicarbonato combinado con 10% de SFB, 10 µg/ml de LH ovina purificada (NIH-oLH-S1), 1 µg/ml de pFSH, 1 µg/ml de 17ß-estradiol y cisteamina 100 µM (de Matos y col., 1995). Los complejos cúmulus-oocitos (COCs) fueron cultivados durante 24 h en gotas de 50 µl de medio de IVM bajo aceite mineral a 39ºC en atmósfera de 5% CO_2, 7% O_2 y 88% N_2, con saturación de humedad.

Fertilización in vitro

Luego de la maduración, los COCs fueron incubados durante 22 h en gotas de 50 µl de medio de fertilización in vitro bajo aceite mineral, con una concentración de $1x10^6$/ml de espermatozoides, seleccionados mediante el procedimiento de Percoll (Parrish y col., 1986) Como medio de fertilización in vitro se empleó TALP combinado con 6 mg/ml de BSA-FAF, penicilamina20 µM, hipotaurina 10 µM, y 10 µg/ml de heparina. El medio TALP fue compuesto según fuera descripto por Parrish y col. (1986).

Cultivo in vitro

Los supuestos cigotos fueron transferidos al medio Synthetic Oviduct Fluid modificado (SOFm; Tervit y col., 1972; Edwards y col., 1997) combinado con glutamina 1 mM, 2% (v/v) de BME, 1% (v/v) de MEM y 4 mg/ml de BSA-FAF (274 a 276 mOsm/l) y cultivados durante 48 h, en gotas de 40 µl bajo aceite mineral (10 embriones por gota), a 39ºC en atmósfera de 5% CO_2, 7% O_2 y 88% N_2, con saturación de humedad. Al cabo de 48 h, los embriones fueron

transferidos al mismo medio pero conteniendo glucosa 1,5 mM (Furnus y col., 1997) e incubados en las mismas condiciones durante 5 días. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 h.

Los embriones fueron clasificados de acuerdo a su estadio de desarrollo y su morfología (Lindner y Wright, 1984). Sólo se emplearon en los experimentos blastocistos en expansión y expandidos de calidad excelente y buena. Los embriones obtenidos en los Días 6 y 7 (generalmente 10 a 20 embriones por día) fueron asignados aleatoriamente a los diferentes tratamientos dentro de cada experimento.

3.2.3. Producción de embriones ovinos obtenidos in vivo

Superovulación e inseminación de las donantes

Como donantes de embriones se emplearon ovejas cruza Merino Australiano x Corriedale adultas (edad: 4 a 6 años; peso corporal promedio ± DS: 56,4 ± 5 kg). Las ovejas fueron divididas en grupos de 6 animales. En cada grupo, se sincronizó el estro empleando esponjas intravaginales conteniendo 60 mg de MAP durante 14 días (Día 0 = Día de inserción de la esponja). Las donantes fueron superovuladas con una dosis total de 250 UI de pFSH administrada en 6 dosis decrecientes a intervalos de 12 h, comenzando 48 h antes de la remoción de la esponja (Naitana y col., 1995). En el momento de la remoción de la esponja, las ovejas fueron colocadas con un macho de fertilidad probada con el pecho pintado para poder detectar aquel animal que había sido montado, y se controló la aparición de marca cada 12 h durante 2 días.

Recolección y evaluación de los embriones

Seis días después de la detección del estro los embriones fueron colectados quirúrgicamente (Baldassarre y col., 1992). Para ello, las donantes fueron tratadas con 0,3 ml de atropina 1%, i.m. y luego anestesiadas con 0,7 ml de

xilazina 2%, i.m., y 5 min más tarde 1,5 ml de clorhidrato de ketamina (50 mg/ml), i.v. Ambos cuernos uterinos fueron expuestos y su interior fue lavado con DPBS combinado con 1% de SFB y 1% de AA (30 ml cada cuerno). Los embriones fueron localizados bajo lupa e inmediatamente colocados en medio de mantenimiento, el cual consistió de DPBS combinado con 10% de SFB y 1% de AA.

Los embriones fueron clasificados de acuerdo a su estado de desarrollo y su apariencia morfológica (Winterberger-Torres y col., 1987). Para los experimentos sólo se emplearon mórulas compactas y blastocistos de calidad excelente y buena. Los embriones recolectados en cada día (usualmente 20 a 30 embriones) fueron asignados aleatoriamente a los diferentes tratamientos dentro de los experimentos.

3.2.4. Producción de embriones ovinos obtenidos in vitro

Aspiración folicular de las donantes

Como donantes de oocitos se emplearon ovejas adultas de cruza Merino Australiano x Corriedale (edad: 4 a 6 años; peso corporal promedio ± DS: 56,4 ± 5,0 kg). Los oocitos fueron aspirados por foliculocentesis empleando una aguja de 18 G x 20 cm conectada a una bomba de vacío (Baldassarre y col., 1996). La aspiración fue guiada empleando un laparoscopio Stortz (Karl Stortz Gmb & Co., KG, Tuttlingen, Alemania).

Como medio para la aspiración de los oocitos se empleó TCM 199 combinado con 0,05 mg/ml de heparina, 100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 0,05 mg/ml de kanamicina, y 0,5% de BSA-FAF.

Maduración in vitro

Una vez extraídos del líquido de aspiración bajo lupa, los oocitos fueron transferidos al medio de mantenimiento compuesto por TCM 199 combinado con HEPES 15 mM (empleado como buffer), 10% de SFB. Para la maduración in vitro (IVM) los oocitos fueron lavados dos veces en medio de mantenimiento y dos veces en medio de maduración compuesto por TCM 199-bicarbonato combinado con 10% de SFB, 10 µg/ml de LH ovina purificada (NIH-oLH-S1), 1 µg/ml de pFSH y 1 µg/ml de 17 ß estradiol. Para la IVM los complejos cúmulus-oocito (COCs) fueron cultivados durante 26 h, en gotas de 50 µl de medio de IVM bajo aceite mineral a 39°C en una incubadora gaseada con 5% CO_2, 7% O_2 y 88% N_2, en saturación de humedad.

Fertilización in vitro

Luego de la maduración, los COCs fueron incubados durante 22 h en gotas de 50 µl de medio de fertilización in vitro bajo aceite mineral, conteniendo 1 x 10^6 espermatozoides, los cuales fueron seleccionados mediante la técnica de Percoll (Parrish y col., 1986).

Cultivo in vitro

Los supuestos cigotos fueron transferidos a medio SOF modificado (SOFm; Gardner y col., 1994; Tervit y col., 1972) e incubados durante 6 días. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 h.

Los embriones obtenidos fueron clasificados de acuerdo a su estadio de desarrollo y su morfología (Winterberger-Torres y col., 1987). Sólo se emplearon en los experimentos blastocistos en expansión y expandidos de calidad excelente y buena. Los embriones obtenidos en los Días 5 y 6 (generalmente 10 a 20 embriones por día) fueron asignados aleatoriamente a los diferentes tratamientos dentro de cada experimento.

3.3. PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN

En todos los tratamientos los embriones fueron cargados individualmente en pajuelas de 0,25 ml (IMV, L'Aigle, Francia). En aquellos tratamientos donde los embriones fueron congelados se empleó una congeladora de metanol (FTS Systems, Stone Ridge, New York, EUA). Una vez criopreservados los embriones fueron almacenados en nitrógeno líquido durante 6 a 12 meses hasta la transferencia.

3.3.1. Protocolos de congelamiento lento

Congelamiento con glicerol – Incorporación en 1 paso (Gli-1P)

Se empleó el protocolo de congelamiento descripto por Elsden y col. (1982) con modificaciones (ver Apéndice). Este protocolo emplea el glicerol como crioprotector, el cual es incorporado en un paso (glicerol 10%). Luego del descongelamiento se realiza la remoción del crioprotector en tres pasos con concentraciones decrecientes de glicerol y la adición de sacarosa 0,3 M en cada paso.

Congelamiento con glicerol – Incorporación en 2 pasos (Gli-2P)

El protocolo fue similar al anterior, excepto por la incorporación del crioprotector, la cual se realizó en dos pasos (ver Apéndice). Aquí se agregó un primer paso consistente en una solución de glicerol 5%. La remoción del crioprotector se realizó de la misma forma que en el protocolo anterior.

Congelamiento con etilenglicol – Incorporación en 1 paso y transferencia directa (Eg-TrDir)

Se empleó el protocolo de congelamiento descripto por Voelkel y Hu (1992). En este protocolo se emplea como crioprotector al etilenglicol, el cual es incorporado en un paso (etilenglicol 1,5 M, ver Apéndice). Ya que este método no requiere la remoción del crioprotector luego del descongelamiento, los embriones son transferidos directamente desde la pajuela en la que fueron congelados.

Congelamiento con propilenglicol – Incorporación en 1 paso y transferencia directa (Pg-TrDir)

Se realizó una modificación en el protocolo descripto en la sección anterior, el cual consistió en el empleo de propilenglicol en reemplazo del etilenglicol (ver Apéndice). El tiempo de incorporación del crioprotector fue de 5 min. La curva de congelamiento y el descongelamiento se realizaron de la misma forma que en el protocolo anterior.

Congelamiento con glicerol – Incorporación en 3 pasos (Gli-3P)

Se empleó el protocolo descripto por Prather y col. (1987) con modificaciones. Este protocolo emplea el glicerol como crioprotector, el cual es incorporado en tres pasos (glicerol 0,5 M, 1,0 M y 1,4 M, ver Apéndice). Luego del descongelamiento se realiza la remoción del crioprotector en tres pasos con concentraciones decreciente de glicerol y la adición de sacarosa 0,5 M en cada paso.

Congelamiento con etilenglicol – Incorporación en 3 pasos (Eg-3P)

Se empleó el protocolo descripto por Tervit y Gold (1984) con modificaciones. Este protocolo emplea el etilenglicol como crioprotector, el cual es incorporado

en tres pasos (etilenglicol 0,5 M, 1,0 M y 1,5 M, ver Apéndice). Luego del descongelamiento se realiza la remoción del crioprotector en tres pasos con concentraciones decrecientes de etilenglicol y la adición de sacarosa 0,5 M en cada paso.

Congelamiento con etilenglicol – Incorporación en 3 pasos modificado (Eg-3P m)

El protocolo fue similar al anterior, excepto por la remoción del crioprotector, la cual se realizó en un paso (sacarosa 0,5 M, ver Apéndice).

3.3.2. Protocolos de vitrificación

Vitrificación con propilenglicol + glicerol (Pg+Gli)

Se empleó el protocolo de vitrificación descripto por Scheffen y col. (1986) y Massip y col. (1986), con modificaciones. Este protocolo emplea glicerol y propilenglicol como crioprotectores para componer la solución de vitrificación (glicerol 25% + propilenglicol 25%, ver Apéndice). Antes de sumergir los embriones en la solución de vitrificación éstos son colocados en una solución de equilibrado. La remoción del crioprotector se realiza en dos pasos empleando sacarosa.

Vitrificación con etilenglicol + Ficoll 70 + sacarosa (EFS)

Se empleó el protocolo de vitrificación descripto por Kasai y col. (1990), modificado por Zhu y col. (1993). Este protocolo emplea etilenglicol, Ficoll 70 y sacarosa como crioprotectores para componer la solución de vitrificación (etilenglicol 40% + Ficoll 70 18% + sacarosa 0,3 M, ver Apéndice). Antes de sumergir los embriones en la solución de vitrificación éstos son colocados en una

solución de equilibrado. La remoción del crioprotector se realiza en un paso empleando sacarosa.

Vitrificación con la solución EFS modificada (EFSm)

Se realizó una modificación del protocolo EFS descripto en la sección anterior. La variante consistió en equilibrar los embriones en dos pasos, antes de ser vitrificados (ver Apéndice).

Vitrificación con etilenglicol + glicerol (Eg+Gli)

Se empleó, con modificaciones, el protocolo de vitrificación descripto por Yang y col. (1992) el cual fue desarrollado como una modificación del protocolo Pg+Gli. Este protocolo emplea etilenglicol y glicerol como crioprotectores para componer la solución de vitrificación (glicerol 25% + etilenglicol 25%, (ver Apéndice). Antes de sumergir los embriones en la solución de vitrificación éstos son colocados en dos soluciones de equilibrado. La remoción del crioprotector se realiza en tres pasos empleando concentraciones decrecientes de sacarosa.

3.4. EVALUACIÓN DE LA SOBREVIDA EMBRIONARIA LUEGO DEL CONGELAMIENTO

3.4.1. Evaluación in vitro de los tratamientos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos

La evaluación in vitro de los embriones descongelados se realizó, luego de la remoción del crioprotector, mediante el cultivo de los mismos en gotas de 50 µl

de SOFm adaptado de acuerdo a lo descripto en las secciones 3.2.2 y 3.2.4 (5 a 7 embriones/gota).

El desarrollo, medido como la formación de blastocele (en las mórulas) o la re-expansión del mismo (en los blastocistos), y la eclosión, fueron evaluados cada 24 h hasta las 72 h para estimar la viabilidad embrionaria. La tasa de desarrollo fue calculada como el cociente entre el número de embriones que formaron o expandieron el blastocele y el número de embriones colocados en cultivo, mientras que la tasa de eclosión fue calculada como el número de embriones que eclosionaron sobre el número de embriones colocados en cultivo.

Finalmente, en los experimentos donde se realizó el recuento del número de núcleos de aquellos blastocistos que sobrevivieron luego de 72 h de cultivo, se empleó para marcar los núcleos el marcador fluorescente específico para ADN Hoechst 33342, observándolos mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot (Nikon Co., Tokio, Japón; de Matos y col., 1995).

3.4.2. Evaluación in vivo de los tratamientos de criopreservación de embriones bovinos

La evaluación de los tratamientos de criopreservación también se realizó por transferencia a receptoras. Se emplearon para ello vacas adultas Polled Hereford (edad: 4 a 6 años; peso corporal promedio ± DS: 398 ± 30 kg). El celo fue sincronizado empleando una única dosis i.m. de 2 ml de Cloprostenol. Siete días después de la detección del estro, los embriones fueron transferidos en forma no quirúrgica (1 embrión por receptora) en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo usando un catéter de transferencia de embriones bovinos (I.M.V., L'Aigle, Francia).

La preñez fue diagnosticada 30 días después de la transferencia, mediante una ecografía transrectal empleando un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokio, Japón) con un transductor lineal de 7,5 MHz. Quince días antes de la fecha estimada de parto, las receptoras preñadas fueron separadas y mantenidas en corrales.

Durante el período de nacimientos, el grupo fue controlado dos veces por día para registrar los partos distócico.

Se definió la tasa de preñez por embriones totales como el cociente entre el número de receptoras preñadas y el número de embriones empleados en cada tratamiento, la tasa de preñez por embriones transferidos como el cociente entre el número de receptoras preñadas y el número de receptoras que recibieron embrión, la tasa de nacimientos por embriones totales como el cociente entre el número de terneros nacidos y el número de embriones empleados en cada tratamiento y tasa de nacimientos por embriones transferidos como el cociente entre el número de terneros nacidos y el número de receptoras que recibieron embrión. La tasa de partos distócicos fue calculada como el cociente entre el número de partos distócicos y el número total de partos. La relación de sexos fue calculada como el cociente entre el número de machos y hembras nacidas, y la longitud de la gestación como el intervalo de tiempo entre las fechas de transferencia y nacimiento, más 6 días (considerada la edad embrionaria).

3.4.3. Evaluación in vivo de los tratamientos de criopreservación de embriones ovinos

Para la evaluación in vivo de embriones ovinos mediante transferencia, se emplearon como receptoras ovejas de cruza Merino Australiano x Corriedale adultas (edad: 4 a 6 años; peso corporal promedio ± DS: 47,0 ± 5,0 kg). El celo fue sincronizado empleando esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de MAP que se mantuvieron durante 14 días. En el momento de la remoción de la esponja se inyectaron 300 UI de PMSG. Seis días después de detectado el estro, los embriones fueron transferidos quirúrgicamente (1 embrión por receptora) bajo anestesia (sección 3.2.3) en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, empleando un catéter Tom-Cat (Sherwood Medical, St. Louis, MO, USA) conectado a una jeringa de 1 ml. Luego de la transferencia, todas las ovejas recibieron una esponja intravaginal con 60 mg de MAP, la cual quedó colocada durante 14 días.

La preñez fue diagnosticada 45 días luego de la transferencia mediante ecografía trans-abdominal, empleando un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokio, Japón) con un transductor lineal de 5,0 MHz. Quince días antes de la fecha estimada de parto, las receptoras preñadas fueron separadas y mantenidas en corrales. Durante el período de nacimientos, el grupo fue controlado dos veces por día para registrar los partos distócicos.

Se definió la tasa de preñez por embriones totales como el cociente entre el número de receptoras preñadas y el número de embriones empleados en cada tratamiento, la tasa de preñez por embriones transferidos como el cociente entre el número de receptoras preñadas y el número de receptoras que recibieron embrión, la tasa de nacimientos por embriones totales como el cociente entre el número de terneros nacidos y el número de embriones empleados en cada tratamiento y tasa de nacimientos por embriones transferidos como el cociente entre el número de terneros nacidos y el número de receptoras que recibieron embrión. La tasa de partos distócicos fue calculada como el cociente entre el número de partos distócicos y el número total de partos. La relación de sexos fue calculada como el cociente entre el número de machos y hembras nacidas, y la longitud de la gestación como el intervalo de tiempo entre las fechas de transferencia y nacimiento, más 6 días (considerada la edad embrionaria).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias en las tasas de desarrollo, eclosión, preñez, nacimientos y partos distócicos y las relaciones de sexos fueron analizadas empleando el test Exacto de Fisher.

Las diferencias en el número de núcleos, longitud de la gestación y peso al nacimiento fueron analizados mediante el test de T o ANOVA, según correspondiera.

Los valores de probabilidad menores que 0,05 fueron considerados como significativos.

Todos los tests fueron realizados empleando el programa Statistica para Windows (Stat Soft Inc., 1999).

4. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS OBTENIDOS IN VIVO

4.1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimas décadas, la criopreservación de embriones bovinos fue mejorada substancialmente debido a factores tales como un incremento en la calidad embrionaria, una selección adecuada de las receptoras y una sincronización apropiada entre la donante y la receptora (Gordon, 1996). Por otra parte, el mejoramiento de los protocolos de criopreservación ha contribuido significativamente al éxito del congelamiento de embriones (Fahning y García, 1992). Las tasas de preñez alcanzadas empleando embriones congelados de alta calidad son sólo un 10% inferiores a las obtenidas usando embriones frescos (Niemann, 1991).

En la actualidad, la técnica más ampliamente usada para la criopreservación de embriones bovinos es el congelamiento lento (Fahning y García, 1992, Niemann, 1991). Recientemente se desarrolló la técnica de transferencia directa, que permite transferir el embrión desde la misma pajuela en la que fue congelado (Leibo, 1984; Massip y col., 1987; Renard y col., 1983; Voelkel y Hu, 1992).

Las condiciones de campo requieren que las técnicas de descongelamiento y transferencia sean lo más simples posible, con máxima eficiencia en cuanto al costo y el trabajo necesarios. En consecuencia, en los últimos años la investigación en el congelamiento de embriones bovinos ha sido dirigida no sólo a alcanzar altas tasas de nacimientos, sino también a simplificar los métodos involucrados (Palasz y Mapletoft, 1996). La técnica ideal debe combinar ambos factores.

El objetivo de este capítulo ha sido evaluar diferentes técnicas de criopreservación en su capacidad para mantener la viabilidad de los embriones bovinos obtenidos in vivo luego de ser congelados. Se compararon dos métodos

de congelamiento lento con glicerol y un método para transferencia directa con etilenglicol. En el último de ellos, se evaluaron diferentes tiempos de incorporación del crioprotector. Finalmente, empleando el método de transferencia directa se compararon dos crioprotectores, etilenglicol y propilenglicol, combinados con tres concentraciones de sacarosa.

4.2. RESULTADOS

Se recuperó un total de 1645 embriones producidos por 215 donantes (7,7 embriones/donante), de los cuales 1413 fueron usados en estos experimentos y 232 no fueron considerados debido a su baja calidad.

4.2.1. Congelamiento lento de embriones bovinos obtenidos in vivo con glicerol y etilenglicol

Se emplearon 419 embriones bovinos obtenidos in vivo, de los cuales 105 fueron congelados con el protocolo Gli-1P, 105 con el protocolo Gli-2P, 105 con el protocolo Eg-TrDir. Como control fueron transferidos en fresco 104 embriones.

Cuando se analizan las tasas de preñez y nacimientos por embriones totales empleados no se observan diferencias entre los diferentes tratamientos de criopreservación. Sólo al comprarlos con el control fresco se observan diferencias significativas principalmente al evaluar los blastocistos (Tabla 1).

Los tratamientos Gli-2P y Eg-TrDir fueron igualmente efectivos, no encontrando diferencias significativas comparados con el control en las tasas de preñez de nacimientos por embriones transferidos. Por el contrario Gli-1P mostró que la tasa de preñez de nacimientos de los blastocistos y de la suma de mórulas y blastocistos fueron significativamente más bajas que el control (Tabla 1).

Cuando se compararon las mórulas con los blastocistos en cada tratamiento solo se encontraron diferencias significativas en Gli-1P.

A partir de estos resultados se decidió utilizar Eg-TrDir para el siguiente experimento.

4.2.2. Efecto del tiempo de equilibrado del crioprotector en el protocolo de transferencia directa

Empleando el protocolo de congelamiento Eg-TrDir, se compararon dos tiempos de incorporación del crioprotector, 5 y 20 min. Para ello se emplearon 224 embriones, de los cuales 75 fueron equilibrados en el crioprotector durante 20 min, 75 fueron equilibrados durante 5 min y 74 embriones fueron transferidos en fresco como control.

Cuando se consideró la suma de mórulas y blastocistos, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de preñez entre el grupo de embriones en los que la incorporación del etilenglicol se realizó durante 5 minutos y los controles transferidos en fresco. En contraste, la tasa de preñez del grupo de embriones que fue expuesto al etilenglicol durante 20 minutos fue significativamente más baja que el control. Cuando mórulas y blastocistos fueron considerados por separado, la exposición durante 20 minutos al etilenglicol mostró ser perjudicial para las mórulas (con tasas de preñez más bajas que los controles), mientras que la exposición durante 5 minutos no lo fue. Este efecto no fue observado en los blastocistos (Tabla 2).

En cada método, no se observaron diferencias significativas en las tasas de preñez y nacimientos al comparar mórulas vs. Blastocistos (Tabla 2).

La tasa de nacimientos del grupo de embriones equilibrado durante 20 minutos fue igual a la del grupo expuesto durante 5 minutos, pero fue significativamente más baja que la del control fresco (Tabla 2).

A partir de estos resultados se fijó como tiempo de incorporación 5 minutos y se decidió comparar medios para transferencia directa formulados con etilenglicol y propilenglicol.

4.2.3. Protocolos de congelamiento con transferencia directa, empleando etilenglicol o propilenglicol, combinados con diferentes concentraciones de sacarosa

Las soluciones Eg-TrDir y Pg-TrDir (ver Materiales y Métodos) fueron combinadas con tres concentraciones diferentes de sacarosa (0, 0,1 o 0,3 M) componiendo entonces seis medios de congelamiento diferentes a ser evaluados.

Se emplearon 770 embriones que se distribuyeron de la siguiente manera: 110 fueron congelados con Eg-TrDir, 110 con Eg-TrDir + sacarosa 0,1 M, 110 con Eg-TrDir + sacarosa 0,3 M, 110 con Pg-TrDir, 110 con Pg-TrDir + sacarosa 0,1 M, 110 con Pg-TrDir + sacarosa 0,3 M, y 110 sirvieron como control fresco.

Las tasas de preñez obtenidas mostraron una mayor eficacia del etilenglicol que el propilenglicol para la criopreservación de blastocistos, diferencia que no se observó en las mórulas. La tasa de preñez de las mórulas criopreservadas con etilenglicol fue mejorada por la adición de sacarosa 0,1 M en la solución de criopreservación, pero este efecto no fue observado luego del agregado de sacarosa 0,3. El uso de etilenglicol con sacarosa 0,1 M no mostró diferencias significativas respecto del control fresco. En el caso del propilenglicol, la adición de sacarosa fue inefectiva o perjudicial (Tabla 3).

Cuando se compararon mórulas y blastocistos dentro de cada tratamiento, se observaron diferencias significativas en el tratamiento de etilenglicol con sacarosa 0,3 M y propilenglicol con sacarosa 0 M.

La combinación de etilenglicol con sacarosa 0,1 M alcanzó las tasas de preñez y nacimientos más alta, no mostrando diferencias significativas respecto del control fresco (Tabla 3 y 4).

Tabla 1. Transferencia de embriones bovinos congelados con Gli-1P, Gli-2P o Eg-TrDir

		Tratamientos			
		Gli-1P	Gli-2P	Eg-TrDir	Control
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas / total de embriones)	M	21/55 (38,2%)[a]*	21/55 (38,2%)[a]	24/55 (43,6%)[a]	31/54 (57,4%)[a]
	B	8/50 (16,0%)[a]*	15/50 (30,0%)[a]	16/50 (32,0%)[a]	27/50 (54,0%)[b]
	M + B	29/105 (27,6%)[a]	36/105 (34,3%)[a]	40/105 (38,1%)[a]	58/104 (55,8%)[b]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas / embriones transferidos)	M	21/50 (42,0%)[a]*	21/44 (47,7%)[a]	24/46 (52,2%)[a]	31/54 (57,4%)[a]
	B	8/42 (19,1%)[a]*	15/40 (37,5%)[ab]	16/42 (38,1%)[ab]	27/50 (54,0%)[b]
	M + B	29/92 (31,5%)[a]	36/84 (42,9%)[ab]	40/88 (45,5%)[ab]	58/104 (55,8%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos / total de embriones)	M	20/55 (36,4%)[a]*	20/55 (36,4%)[a]	23/55 (41,8%)[ab]	31/54 (57,4%)[b]
	B	7/50 (14,0%)[a]*	15/50 (30,0%)[a]	16/50 (32,0%)[ab]	26/50 (52,0%)[b]
	M + B	27/105 (25,7%)[a]	35/105 (33,3%)[a]	39/105 (37,1%)[a]	57/104 (54,8%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Terneros nacidos / embriones transferidos)	M	20/50 (40,0%)[a]*	20/44 (45,5%)[a]	23/46 (50,0%)[a]	31/54 (57,4%)[a]
	B	7/42 (16,7%)[a]*	15/40 (37,5%)[ab]	16/42 (38,1%)[ab]	26/50 (52,0%)[b]
	M + B	27/92 (29,3%)[a]	35/84 (41,7%)[ab]	39/88 (44,3%)[ab]	57/104 (54,8%)[b]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Los valores con superíndices distintos dentro de las filas y con asterisco dentro de las columnas difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 2. Transferencia de embriones bovinos congelados con Eg-TrDir comparando 20 min o 5 min de exposición al crioprotector

		Tratamientos		
		20 min	5 min	Control
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas / total de embriones)	M	17/45 (37,8%)[a]	20/45 (44,4%)[ab]	27/44 (61,4%)[b]
	B	12/30 (40,0%)[a]	12/30 (40,0%)[a]	16/30 (53,3%)[a]
	M + B	29/75 (38,7%)[a]	32/75 (42,7%)[ab]	43/74 (58,1%)[b]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas / embriones transferidos)	M	17/43 (39,5%)[a]	20/44 (45,5%)[ab]	27/44 (61,4%)[b]
	B	12/29 (41,4%)[a]	12/28 (42,9%)[a]	16/30 (53,3%)[a]
	M + B	29/72 (40,3%)[a]	32/72 (44,4%)[ab]	43/74 (58,1%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos / total de embriones)	M	17/45 (37,8%)[a]	20/45 (44,4%)[ab]	27/44 (61,4%)[b]
	B	12/30 (40,0%)[a]	12/30 (40,0%)[a]	15/30 (50,0%)[a]
	M + B	29/75 (38,7%)[a]	32/75 (42,7%)[ab]	42/74 (56,8%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Terneros nacidos / embriones transferidos)	M	17/43 (39,5%)[a]	20/44 (45,5%)[ab]	27/44 (61,4%)[b]
	B	12/29 (41,4%)[a]	12/28 (42,9%)[a]	15/30 (50,0%)[a]
	M + B	29/72 (40,3%)[a]	32/72 (44,4%)[ab]	42/74 (56,8%)[b]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Los valores con superíndices distintos dentro de las filas difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 3. Tasas de preñez luego de la transferencia de embriones bovinos congelados con etilenglicol o propilenglicol combinados con sacarosa 0, 0,1 o 0,3 M.

		Tratamientos						
		Eg-TrDir			Pg-TrDir			Control
Sacarosa		0 M	0,1 M	0,3 M	0 M	0,1 M	0,3 M	---
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas/ total de embriones)	M	20/60 (33,3%)[ac]	32/60 (53,3%)[b]	11/60 (18,3%)[c]*	24/60 (40,0%)[ab]*	10/60 (16,7%)[c]	5/60 (8,3%)[d]	35/60 (58,3%)[b]
	B	12/50 (24,0%)[ac]	20/50 (40,0%)[ab]	19/50 (38,0%)[ab]*	3/50 (6,0%)[d]*	9/50 (18,0%)[cd]	3/50 (6,0%)[d]	27/50 (54,0%)[b]
	M + B	32/110 (29,1%)[a]	52/110 (47,3%)[b]	30/110 (27,3%)[a]	27/110 (24,6%)[a]	19/110 (17,3%)[a]	8/110 (7,3%)[c]	62/110 (56,4%)[b]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas/ embriones transfer)	M	20/60 (33,3%)[ac]	32/59 (54,2%)[b]	11/60 (18,3%)[c]*	24/59 (40,7%)[ab]*	10/58 (17,2%)[c]	5/58 (8,6%)[d]	35/60 (58,3%)[b]
	B	12/48 (25,0%)[ac]	20/49 (40,8%)[ab]	19/47 (40,4%)[ab]*	3/48 (6,3%)[d]*	9/45 (20,0%)[cd]	3/48 (6,3%)[d]	27/50 (54,0%)[b]
	M + B	32/108 (29,6%)[a]	52/108 (48,2%)[b]	30/107 (28,0%)[a]	27/107 (25,2%)[a]	19/103 (18,5%)[a]	8/106 (7,6%)[c]	62/110 (56,4%)[b]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Los valores con superíndices distintos dentro de las filas y con asterisco dentro de las columnas difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 4. Tasa de nacimientos luego de la transferencia de embriones bovinos congelados con etilenglicol o propilenglicol combinados con sacarosa 0, 0,1 o 0,3 M.

		Tratamientos						
		Eg-TrDir			Pg-TrDir			Control
Sacarosa		0 M	0,1 M	0,3 M	0 M	0,1 M	0,3 M	---
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos/ total de embriones)	M	19/60 (31,7%)[ac]	32/60 (53,3%)[bd]	11/60 (18,3%)[ce]*	21/60 (35,0%)[ad]*	10/60 (16,7%)[ce]	4/60 (6,7%)[e]	34/60 (56,7%)[b]
	B	12/50 (24,0%)[ac]	20/50 (40,0%)[ab]	19/50 (38,0%)[ab]*	2/50 (4,0%)[d]*	9/50 (18,0%)[cd]	2/50 (4,0%)[d]	27/50 (54,0%)[b]
	M + B	31/110 (28,2%)[a]	52/110 (47,3%)[b]	30/110 (27,3%)[a]	23/110 (20,9%)[a]	19/110 (17,3%)[a]	6/110 (5,5%)[c]	61/110 (55,4%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Nacimientos/embriones transfer)	M	19/60 (31,7%)[ac]	32/59 (54,2%)[bd]	11/60 (18,3%)[ce]*	21/59 (35,6%)[ad]*	10/58 (17,2%)[ce]	4/58 (6,9%)[e]	34/60 (56,7%)[b]
	B	12/48 (25,0%)[ac]	20/49 (40,8%)[ab]	19/47 (40,4%)[ab]*	2/48 (4,2%)[d]*	9/45 (20,0%)[cd]	2/48 (4,2%)[d]	27/50 (54,0%)[b]
	M + B	31/108 (28,7%)[a]	52/108 (48,1%)[b]	30/107 (28,0%)[a]	23/107 (21,5%)[a]	19/103 (18,5%)[a]	6/106 (5,7%)[c]	61/110 (55,4%)[b]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Los valores con superíndices distintos dentro de las filas y con asterisco dentro de las columnas difieren significativamente ($P<0,05$).

4.3. DISCUSIÓN

Los resultados del Experimento 1 demostraron que cuando se consideran mórulas y blastocistos en conjunto los tratamientos Gli-1P, Gli-2P y Eg-TrDir no fueron diferentes en cuanto a su tasa de preñez. Sin embargo, como Gli-1P mostró un efecto adverso sobre los blastocistos en particular, este método no es recomendado para propósitos prácticos. Este fenómeno esta asociado al menor tamaño de las células de los blastocistos, lo cual resulta en una menor relación superficie/volumen, comparados con las mórulas (Széll y col., 1989). Esta diferencia hace que el crioprotector entre en menor proporción al medio intracelular, con la consiguiente deficiencia en la crioprotección. Además, un tiempo de exposición más largo al glicerol en el tratamiento Gli-2P (en total 10 min) comparado con Gli-1P (en total 5 min) mejoró la tasa de preñez, porque compensa el efecto negativo del tamaño celular con un aumento del tiempo de exposición. Por ello no se encuentran diferencias significativas en las tasas de preñez entre mórulas y blastocistos cuando se usa Gli-2P (Széll y col., 1989). Por otro lado, este efecto tampoco se observa cuando se usa etilenglicol, quien tiene una mayor permeabilidad a través de la membrana celular que el glicerol (Széll y col., 1989).

Debido a que Eg-TrDir no presentó diferencias significativas en Gli-2P y que, por otra parte, es más fácil de aplicar en condiciones de campo, fue el elegido para realizar el paso siguiente. Dicho paso consistió en ajustar el tiempo de equilibrado del crioprotector. Para este propósito se consideró la alta tasa de permeabilidad del etilenglicol, por ello en el Experimento 2 se compararon 5 y 20 min de exposición. No se observaron diferencias en la tasa de preñez entre 20 min y 5 min, tanto entre las mórulas como entre los blastocistos. Sin embargo, las tasas de preñez de las mórulas expuestas durante 20 min al crioprotector fueron más bajas que las del control fresco, esta diferencia no fue evidente luego de 5 min de equilibrado. Una posible explicación para esta diferencia estaría basada en el tiempo de exposición más corto (Niemann, 1991; Voelkel y Hu, 1992). Nuevamente, como en el Experimento 1, en el caso de los blastocistos, que tienen una menor relación superficie/volumen que las mórulas, la difusión

del crioprotector al interior de la célula sería de menor magnitud que en las mórulas; por esta razón, no habría diferencias entre los tiempos de equilibrado en estadios avanzados del desarrollo embrionario (Voelkel y Hu, 1992).

El hecho de que la incorporación del etilenglicol durante 5 min no mostrara diferencias significativas con respecto a los controles (en contraste con lo observado en los 20 min de incorporación) podría deberse a que la corta exposición previene el potencial efecto tóxico que se observa a tiempos mayores.

Cuando se evaluaron diferentes combinaciones de etilenglicol o propilenglicol con sacarosa (Experimento 3), se observó que etilenglicol con sacarosa 0,1 M resultó en las tasas de preñez más altas, las cuales fueron similares a aquellas obtenidas tanto por las mórulas como por los blastocistos transferidos en fresco. En términos generales, el uso de propilenglicol no fue beneficioso para el conjunto de los embriones, y pese a que la adición de sacarosa al medio de congelamiento con etilenglicol fue beneficiosa, no lo fue cuando se lo combinó con propilenglicol. El uso de una concentración mayor de sacarosa (0,3 M) resultó en tasas de preñez más bajas. Este hecho coincide con estudios previos (Leibo, 1984; Somgsasen y col., 1995; Széll y Shelton, 1986) que sugieren que el uso de altas concentraciones de sacarosa como buffer osmótico tiene un efecto adverso sobre los embriones congelados, lo cual podría desarrollar problemas de permeabilidad de membrana.

Los resultados obtenidos in vivo comparando etilenglicol y propilenglicol coinciden con los resultados obtenidos in vitro por Voelkel y Hu (1992). Estos autores observaron que el etilenglicol es más efectivo que el propilenglicol para la criopreservación de embriones bovinos cuando se emplea el método de transferencia directa. En contraste, Suzuki y col. (1989) reportaron altas tasas de preñez luego de transferir embriones bovinos que habían sido congelados empleando propilenglicol 1,6 M para transferencia directa.

Como conclusión de este capítulo, se encontraron tasas de preñez similares luego de transferir embriones empleando los métodos de pasos múltiples o transferencia directa. El método de transferencia directa es preferible debido a su

simplicidad; este método fue elegido para continuar el estudio ya que tiene mayores ventajas para ser aplicado en condiciones de campo. El equilibrado durante 5 min en etilenglicol resultó en tasas de preñez similares a aquellas obtenidas luego de la transferencia de embriones en fresco. El etilenglicol probó ser más efectivo que el propilenglicol para el método de transferencia directa, y el uso de una baja concentración de sacarosa fue beneficiosa.

El método de transferencia directa ofrece una obvia ventaja en lugares donde no se dispone de las instalaciones adecuadas. Como fue sugerido por Voelkel y Hu (1992), el método de transferencia directa eliminó la necesidad de contar con personal especializado durante la transferencia embrionaria, la cual puede ser realizada por un técnico apropiadamente entrenado. Esto pondría a la transferencia embrionaria en el mismo nivel de complejidad que la inseminación artificial con semen congelado (Gordon**,** 1996).

5. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS OBTENIDOS IN VITRO

5.1. INTRODUCCIÓN

Desde que, en 1973, fue reportado el nacimiento del primer ternero a partir de un embrión congelado (Wilmut y Rowson, 1973), se han realizado progresos considerables que han conducido a mejora los métodos de criopreservación para embriones obtenidos in vivo (Fahning y García, 1992; Niemann, 1991). En años recientes, los mayores esfuerzos han sido dirigidos a mejorar la tasa de sobrevida de los embriones obtenidos in vitro luego de la criopreservación (Hasler y col., 1995; Kaidi y col., 2000; Leibo y Loskutoff, 1993; Mahmoudzadeh y col., 1994; Massip y col., 1993; Palasz y col., 1997; Sommerfeld y Niemman, 1999; Suzuki y col., 1993; Vajta y col., 1996; Wurth y col., 1994). Para ello se han empleado dos enfoques: modificar los sistemas de cultivo in vitro y desarrollar técnicas de criopreservación especialmente adaptados a este tipo de embriones (Greve y col., 1993; Massip y col., 1995; Vajta, 1997).

Los diferentes procedimientos de criopreservación empleados con embriones bovinos obtenidos in vitro no han establecido ventajas y desventajas definitivas en la comparación de la vitrificación con el congelamiento lento. Empleando embriones bovinos obtenidos in vitro, Liu y col. (1996) y Mahmoudzadeh y col. (1994) obtuvieron mejores resultados cuando emplearon la vitrificación que cuando emplearon el congelamiento lento, mientras que Dinnyès y col. (1996) encontraron un efecto benéfico de la vitrificación sobre el desarrollo pero no sobre la eclosión post descongelamiento. Cuando se evaluaron las tasas de sobrevida luego de la transferencia de embriones vitrificados o congelados, se alcanzaron resultados contradictorios (Agca y col., 1996; Wurth y col., 1994). Para dilucidar esta controversia, se necesita desarrollar más investigación.

El objetivo del capítulo ha sido evaluar técnicas de criopreservación en su capacidad para mantener la viabilidad de los embriones bovinos obtenidos in vitro luego de ser criopreservados. Se evaluó la sobrevida in vitro de los embriones luego de ser criopreservados con protocolos de congelamiento lento y de vitrificación. Luego se evaluó la sobrevida embrionaria luego de la criopreservación mediante transferencias.

5.2. RESULTADOS

Se procesó un total de 10170 oocitos, de los cuales clivaron luego de la fertilización 7587 (74,6%) y 2132 de ellos alcanzaron el estadio de blastocisto (28,1%). En los experimentos se empleó un total de 1784 blastocistos, y 348 no fueron incluidos en los experimentos debido de su mala calidad.

5.2.1. Efecto del congelamiento lento con glicerol adicionado en 1 y 2 pasos en la sobrevida in vitro de embriones bovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 90 embriones para comparar la sobrevida in vitro luego del congelamiento lento con glicerol. De ellos, 45 fueron congelados con el protocolo Gli-1P y 45 con el protocolo Gli-2P. Se analizó la capacidad de los blastocistos de día 6 y día 7 para ser congelados.

No se encontraron diferencias significativas en las tasas de desarrollo de los embriones luego del congelamiento con ambos protocolos (Tabla 1). Tampoco se encontraron diferencias entre los embriones de día 6 y día 7, ni en el promedio del número de núcleos de aquellos embriones que sobrevivieron (Tabla 2).

5.2.2. Efecto de la vitrificación con las soluciones Pg+Gli y EFS en la sobrevida in vitro de embriones bovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 244 embriones para comparar la sobrevida in vitro luego de la vitrificación, 120 de los cuales fueron vitrificados con la solución Pg+Gli y 124 con EFS.

Los embriones vitrificados con EFS alcanzaron tasas de desarrollo y eclosión más altas que aquellos vitrificados con Pg+Gli tanto en el grupo de día 6 como en el de día 7. También fueron significativas las diferencias cuando se comparó la suma de los resultados de los embriones de Día 6 + Día 7. No se observaron diferencias significativas tanto en las tasas de desarrollo como de eclosión en la vitrificación de embriones de día 6 y día 7 dentro de cada método de vitrificación (Tabla 3).

También se encontraron diferencias significativas en el promedio del número de núcleos de aquellos embriones que sobrevivieron a la vitrificación (Tabla 4).

5.2.3. Efecto de la vitrificación con las soluciones EFS, EFSm y Eg+Gli en la sobrevida in vitro de embriones bovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 370 embriones para comparar la sobrevida in vitro luego de la vitrificación, 123 de los cuales fueron vitrificados con EFS, 123 con EFSm y 124 con Eg+Gli.

No hubo diferencias significativas en las tasas de desarrollo entre las soluciones. Con respecto a las tasas de eclosión, EFSm y Eg+Gli alcanzaron valores más altos que EFS en la evaluación en los embriones de Día 6, Día 7 y Día 6 + Día 7. Fueron también significativas las diferencias entre los embriones de Día 6 vitrificados con EFS y Eg+Gli. Sin embargo, no hubo diferencias en las tasas de desarrollo y eclosión entre los embriones bovinos obtenidos in vitro de Día 6 y Día 7 dentro de cada tratamiento (Tabla 5).

Por otra parte las soluciones EFSm y Eg+Gli tuvieron un número promedio de núcleos significativamente mayor que la solución EFS (Tabla 6).

5.2.4. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la vitrificación sobre embriones bovinos obtenidos in vitro

Se evaluó la sobrevida in vitro de los embriones luego de la vitrificación con la solución Eg+Gli, la cual fue combinada con diferentes concentraciones de sacarosa.

Se emplearon 480 embriones, 120 de los cuales fueron vitrificados con Eg+Gli, 120 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 M, 120 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,3 M y 120 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,5 M.

No hubo diferencias significativas en las tasas de desarrollo entre las soluciones. La tasa de eclosión mostró que el agregado de sacarosa 0,1 ó 0,3 M resultó beneficiosa, efecto que se revirtió cuando la concentración de sacarosa fue mayor (0,5 M). No hubo diferencias en las tasas de desarrollo y eclosión en la comparación entre los embriones de Día 6 y Día 7 dentro de cada tratamiento (Tabla 7).

Cuando se analizó el número de núcleos, se observó un efecto beneficioso experimentado por el grupo en el que se agregó sacarosa 0,1 M a la solución Eg+Gli (Tabla 8).

5.2.5. Efecto del congelamiento lento y de la vitrificación en la sobrevida luego de la transferencia de embriones bovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 600 embriones obtenidos in vitro, 100 de los cuales fueron congelados con el protocolo Gli-1P, 100 con el protocolo Eg-TrDir, 100 fueron vitrificados con la solución EFSm, 100 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 M, 100 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,3 M y 100 fueron usados como control

fresco. Además, 100 embriones obtenidos in vivo fueron transferidos como control.

Tanto las tasas de preñez, como las tasas de nacimientos fueron significativamente mayores para los embriones obtenidos in vivo que para los obtenidos in vitro cualquiera fuera el tratamiento. Las tasas de preñez y nacimientos por embrión transferido de los embriones obtenidos in vitro transferidos en fresco fueron iguales a las de los embriones vitrificados. Finalmente, la tasa de nacimientos por embrión transferido de los embriones congelados con el protocolo Eg-TrDir fue significativamente menor que la de los embriones obtenidos in vitro transferidos en fresco y aquellos vitrificados con las soluciones Eg+Gli + sacarosa 0,1 M y Eg+Gli + sacarosa 0,3 M (Tabla 9).

No hubo diferencias significativas en el longitud de la gestación y la proporción de sexos entre los tratamientos. Hubo diferencias significativas entre el peso al nacimiento de los embriones obtenidos in vivo con respecto a los obtenidos in vitro (Tabla 10).

Hubo una incidencia significativamente mayor de partos distócicos entre el grupo de receptoras que recibieron embriones obtenidos in vitro (Tabla 11). No se registraron muertes de terneros.

Tabla 1. Tasas de desarrollo y de eclosión de embriones bovinos obtenidos in vitro congelados con los protocolos Gli-1P y Gli-2P

	Tratamientos	Día 6	Día 7	Día 6 + Día 7
Desarrollo	Gli-1P	9/26 (34,6%)[a]	5/19 (26,3%)[a]	14/45 (31,1%)[a]
	Gli-2P	10/26 (38,5%)[a]	7/19 (36,8%)[a]	17/45 (37,8%)[a]
Eclosión	Gli-1P	8/26 (30,8%)[a]	5/19 (26,3%)[a]	13/45 (28,9%)[a]
	Gli-2P	5/26 (19,2%)[a]	4/19 (21,1%)[a]	9/45 (20,0%)[a]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Valores con superíndices distintos dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 2. Número de núcleos de embriones bovinos obtenidos in vitro congelados con los protocolos Gli-1P y Gli-2P

Tratamientos	N	Número de núcleos
Gli-1P	14	108,9±27,0 [a]
Gli-2P	17	102,9±14,1 [a]

Los valores están expresados como el promedio del número de núcleos, con el desvío estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 3. Tasas de desarrollo y de eclosión de embriones bovinos obtenidos in vitro vitrificados con Pg+Gli y EFS

	Tratamientos	Día 6	Día 7	Día 6 + Día 7
Desarrollo	Pg+Gli	14/44 (31,8%)[a]	26/76 (34,2%)[a]	40/120 (33,3%)[a]
	EFS	28/46 (60,8%)[b]	42/78 (53,8%)[b]	70/124 (56,4%)[b]
Eclosión	Pg+Gli	6/44 (13,6%)[a]	10/76 (13,1%)[a]	16/120 (13,3%)[a]
	EFS	18/46 (39,1%)[b]	26/78 (33,3%)[b]	44/124 (35,4%)[b]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Los valores con superíndices distintos dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 4. Número de núcleos de embriones bovinos obtenidos in vitro vitrificados con las soluciones Pg+Gli y EFS

Tratamientos	N	Número de núcleos
Pg+Gli	40	98,4±30,4 [a]
EFS	70	119,7±42,5 [b]

Los valores están expresados como el promedio del número de núcleos, con el desvío estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 5. Tasas de desarrollo y de eclosión de embriones bovinos obtenidos in vitro vitrificados con EFS, EFSm o Eg+Gli

	Tratamientos	Día 6	Día 7	Día 6 + Día 7
Desarrollo	EFS	24/48 (50,0%)[a]	47/75 (62,6%)[a]	71/123 (57,7%)[a]
	EFSm	32/49 (65,3%)[a]	50/74 (67,5%)[a]	82/123 (66,6%)[a]
	Eg+Gli	33/49 (67,3%)[a]	48/75 (64,0%)[a]	81/124 (65,3%)[a]
Eclosión	EFS	14/48 (29,1%)[a]	30/75 (40,0%)[a]	44/123 (35,7%)[a]
	EFSm	25/49 (51,0%)[b]	46/74 (62,1%)[b]	71/123 (57,7%)[b]
	Eg+Gli	31/49 (63,2%)[b]	43/75 (57,3%)[b]	74/124 (59,6%)[b]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Los valores con superíndices distintos dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 6. Número de núcleos de embriones bovinos obtenidos in vitro vitrificados con EFS, EFSm o Eg+Gli

Tratamientos	N	Número de núcleos
EFS	44	115,1±35,7 [a]
EFSm	71	131,8±48,0 [b]
Eg+Gli	74	133,3±40,1 [b]

Los valores están expresados como el promedio del número de núcleos, con el desvío estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 7. Tasa de desarrollo y eclosión de embriones bovinos obtenidos in vitro vitrificados con la solución Eg+Gli combinado con diferentes concentraciones de sacarosa

	Concentración de sacarosa	Día 6	Día 7	Día 6+7
Desarrollo	0 M	42/62 (67,7%)[a]	45/58 (77,5%)[a]	87/120 (72,5%)[a]
	0,1 M	42/64 (65,6%)[a]	44/56 (78,6%)[a]	86/120 (71,6%)[a]
	0,3 M	46/62 (74,2%)[a]	36/58 (62,1%)[a]	82/120 (68,3%)[a]
	0,5 M	36/62 (58,1%)[a]	37/58 (63,7%)[a]	73/120 (60,8%)[a]
Eclosión	0 M	29/62 (46,7%)[ac]	26/58 (44,8%)[a]	55/120 (45,8%)[a]
	0,1 M	42/64 (65,6%)[b]	38/56 (67,8%)[b]	80/120 (66,6%)[b]
	0,3 M	40/62 (64,5%)[ab]	32/58 (55,1%)[ab]	72/120 (60,0%)[b]
	0,5 M	28/62 (45,1%)[c]	26/58 (44,8%)[a]	54/120 (45,0%)[a]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Valores con diferentes superíndices dentro de las columnas difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 8. Número de núcleos de embriones bovinos obtenidos in vitro vitrificados con Eg+Gli combinado con diferentes concentraciones de sacarosa

Concentración de sacarosa	N	Número de núcleos
0 M	87	92,7±36,0 [a]
0,1 M	86	127,4±49,4 [b]
0,3 M	82	111,4±48,4 [ab]
0,5 M	73	99,6±39,4 [a]

Los valores están expresados como el promedio del número de núcleos, con el desvío estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 9. Transferencia de embriones bovinos transferidos en fresco o criopreservados

	Tratamientos						
	Fresco in vivo	Fresco in vitro	Gli-1P	Eg-TrDir	EFSm	Eg+Gli + sacarosa 0,1 M	Eg+Gli + sacarosa 0,3 M
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas / total de embriones)	75/100 (75,0%)[a]	51/100 (51,0%)[b]	17/100 (17,0%)[c]	28/100 (28,0%)[cd]	32/100 (32,0%)[d]	40/100 (40,0%)[bd]	41/100 (41,0%)[bd]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas / embriones transferidos)	75/100 (75,0%)[a]	51/100 (51,0%)[b]	17/75 (22,7%)[c]	28/79 (35,4%)[bc]	32/80 (40,0%)[b]	40/81 (49,4%)[b]	41/82 (50,0%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos / total de embriones)	75/100 (75,0%)[a]	49/100 (49,0%)[b]	16/100 (16,0%)[c]	24/100 (24,0%)[c]	28/100 (28,0%)[cd]	40/100 (40,0%)[bd]	38/100 (38,0%)[bd]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Terneros nacidos / embriones transferidos)	75/100 (75,0%)[a]	49/100 (49,0%)[b]	16/75 (21,3%)[c]	24/79 (30,4%)[cd]	28/80 (35,0%)[bd]	40/81 (49,4%)[b]	38/82 (46,3%)[bd]

Valores con diferentes superíndices dentro de las filas difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 10. Longitud de la gestación, peso al nacimiento y proporción de sexos después de la transferencia de embriones bovinos obtenidos in vitro transferidos en fresco o criopreservados, y de embriones obtenidos in vivo transferidos en fresco

Tratamientos	Longitud de la gestación (días)	Peso al nacimiento (kg)	Proporción de sexos (m:h)
Fresco in vivo	284,0±1,5 [a]	35,5±3,0 [a]	40:35 [a]
Fresco in vitro	283,1±1,3 [a]	39,1±2,0 [b]	25:24 [a]
Gli-1P	284,1±2,1 [a]	40,1±2,7 [b]	6:10 [a]
Eg-TrDir	280,9±2,0 [a]	39,5±3,1 [b]	13:11 [a]
EFSm	285,1±3,3 [a]	39,1±2,0 [b]	14:14 [a]
Eg+Gli + sacarosa 0,1 M	282,8±1,4 [a]	41,2±3,8 [b]	22:18 [a]
Eg+Gli + sacarosa 0,3 M	283,0±1,4 [a]	39,1±2,2 [b]	21:17 [a]

Los valores están expresados como los promedios del longitud de la gestación y peso al nacimiento, con el desvío estandar. Los valores con diferentes superíndices dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 11. Partos distócicos luego de la transferencia de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro

Origen de los embriones	Partos distócicos
Obtenidos in vivo	3/75 (4,0%)[a]
Obtenidos in vitro	57/195 (29,2%)[b]

Los valores están expresados como el cociente entre partos asistidos/total de partos. Los valores con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05).

5.3. DISCUSIÓN

En el Experimento 1 no se encontraron diferencias en las tasas de sobrevida in vitro ni en el número promedio de núcleos de aquellos embriones que sobrevivieron al congelamiento lento cuando el número de pasos de incorporación fue aumentado de 1 a 2.

Cuando se vitrificó con la solución EFS a los blastocistos obtenidos in vitro (Experimento 2), se obtuvieron mejores resultados que cuando se empleó la solución de vitrificación Pg+Gli, tanto en la evaluación de las tasas de desarrollo y de eclosión como en el número promedio de núcleos. Este hecho puede ser explicado por la mayor permeabilidad del etilenglicol en la membrana celular de los embriones comparado con el propilenglicol y el glicerol (Palasz y Mapletoft, 1996). Además, la sacarosa y el Ficoll 70 (crioprotectores no permeables) confieren un efecto protector adicional a la solución EFS, mientras que Pg+Gli no posee crioprotectores no permeables en su formulación. La sacarosa causa la deshidratación del embrión, con lo cual reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular y aumenta la concentración de macromoléculas en el citoplasma, facilitando de esa forma la vitrificación intracelular (Rall, 1987), mientras que el uso de Ficoll 70 como una macromolécula facilita la vitrificación y previene la formación de hielo extracelular durante la vitrificación y el proceso de descongelamiento (Fahy y col., 1984; Kasai y col., 1990). Estos resultados confirman hallazgos previos según los cuales la adición de azúcares tales como sacarosa, dextrosa o trealosa, y macromoléculas tales como polietilenglicol, Ficoll 70 y polivinilpirrolidona mejoraban la sobrevida in vitro de los blastocistos después de la vitrificación (Ohboshi y col., 1997; Saha y col., 1996; Saito y col., 1994).

El Experimento 3 mostró que no hubo diferencias en las tasas de desarrollo entre las tres soluciones de vitrificación utilizadas, EFS, EFSm y Eg+Gli. Sin embargo, la tasa de eclosión y el número promedio de núcleos de los embriones vitrificados con la solución EFS (1 paso de equilibrado) fueron menores que la de aquellos vitrificados con las soluciones EFSm y Eg+Gli (ambas emplearon 2 pasos de

equilibrado). Una diferencia esencial mostró estar relacionada con el número de pasos y/o la concentración del crioprotector en los pasos antes de la vitrificación más que con la combinación de los crioprotectores. Estos resultados son similares a aquellos reportados en trabajos previos, donde se mostró que un incremento en el número de pasos de equilibrado antes de la inmersión final en la solución de vitrificación fue acompañado por un incremento de la sobrevida embrionaria luego de la remoción del crioprotector (Darvedil y col., 1994; Kuwayama y col., 1992; Mahmoudzadeh y col., 1995; Ohboshi y col., 1997).

En el Experimento 4 no se encontraron diferencias en las tasas de desarrollo entre los tratamientos en los que se varió la concentración de sacarosa adicionada a la solución Eg+Gli. Sin embargo, el uso de la solución Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 y 0,3 M mostró tasas de eclosión y promedio del número de núcleos mayores que las soluciones Eg+Gli sin sacarosa y con sacarosa 0,5 M. La sacarosa confiere un efecto protector adicional debido a que este crioprotector no permeable provoca la deshidratación del embrión, con lo cual reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular y provoca una concentración de las macromoléculas del citoplasma, facilitando la vitrificación intracelular (Rall, 1987). Estos resultados confirman los hallazgos previos sobre una mejora en la sobrevida in vitro de los blastocistos luego de la vitrificación con adición de azúcares tales como la sacarosa, dextrosa y trealosa (Saito y col., 1994). Sin embargo, sólo el uso de bajas concentraciones de sacarosa (0,1 y 0,3 M) tiene un efecto positivo, por cuanto una concentración más alta (0,5 M) resultó en menores tasas de eclosión. Esto coincide con estudios previos (Leibo, 1984; McWilliams y col., 1991; Somgsasen y col., 1995; Széll y Shelton, 1986) que sugieren que el uso de concentraciones altas de sacarosa como un buffer osmótico tiene efectos adversos sobre los embriones congelados y descongelados, los cuales podrían ser permeables a los solutos.

En ninguno de los cuatro experimentos analizados hasta aquí se encontraron diferencias significativas al comparar las tasas de sobrevida de los embriones obtenidos en Día 6 y Día 7. Por lo tanto, podemos concluir que, sin importar el día de cultivo, en nuestro sistema de producción in vitro de embriones bovinos,

el comportamiento de los blastocistos en presencia de la soluciones de vitrificación fue similar. Muchos estudios han reportado diferencias en la criopreservación de blastocistos obtenidos en diferente día de cultivo (Hasler y col., 1995; Hasler y col., 1997; Mahmoudzadeh y col., 1995; Massip y col., 1995; Ohboshi y col., 1997; Saha y Suzuki 1997; Vajta y col., 1996). El uso de diferentes sistemas de cultivo provee condiciones específicas necesarias para la producción del embrión. Asimismo, las características morfológicas y bioquímicas del embrión después del cultivo están condicionadas por el sistema de cultivo empleado (Kaidi y col., 1998; Massip y col., 1995; Ohboshi y col., 1997; Pugh y col., 1998; Yamashita y col., 1999), y esto podría explicar muchas diferencias en los resultados obtenidos en estudios previos.

En el Experimento 5 se encontró que las tasas de preñez y nacimientos de los embriones obtenidos in vivo fueron mayores que las de aquellos obtenidos in vitro, lo cual está relacionado con la menor robustez de estos últimos (Greve y col., 1993; Massip y col., 1995).

Al comparar entre sí los tratamientos que involucraron a los embriones obtenidos in vitro se observó que tanto aquellos que fueron transferidos en fresco como los que fueron vitrificados consiguieron mayores tasas de éxito, mostrando que los embriones obtenidos in vitro son particularmente sensibles al congelamiento lento. Estos resultados coinciden con trabajos previos realizados también con embriones bovinos pero con otros protocolos de congelamiento (Massip y col., 1995; Tachikawa y col., 1993).

No hubo diferencias entre los tratamientos ni en el longitud de la gestación ni en la proporción de sexos. El peso al nacer de los terneros obtenidos a partir de embriones obtenidos in vitro fue mayor que el de los obtenidos a partir de los embriones obtenidos in vivo. El incremento en el peso condujo a un incremento significativo del número de partos distócicos. Este hecho ha sido reportado previamente (Farin y Farin 1997; Walker y col., 1996). La obtención de terneros inusualmente grandes a partir de los embriones obtenidos in vitro podría ser un factor limitante para el uso de este tipo de embriones en programas comerciales.

Nuestros resultados coinciden parcialmente con un importante estudio de campo (Van Wagtendonk-De Leeuw y col., 1998) donde se compararon los terneros obtenidos luego de la transferencia de embriones bovinos obtenidos in vitro con aquellos obtenidos por inseminación artificial. En dicho estudio se obtuvieron más machos a partir de embriones obtenidos in vitro y el largo de la gestación fue mayor, en contraste con lo observado en el presente estudio. Sin embargo ambos estudios coinciden en que los terneros obtenidos a partir de los embriones obtenidos in vitro fueron más pesados que aquellos obtenidos in vivo.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo (de Matos y col., 1995) se encontró que los blastocistos de Día 6 congelados con glicerol mostraron mayores tasas de sobrevida in vitro post descongelamiento que aquellos obtenidos en el Día 7. En el presente estudio, la edad de los embriones en el momento de la vitrificación no tubo efecto en la sobrevida in vitro, sugiriendo que la vitrificación podría ser más adecuada que el congelamiento lento para la criopreservación de los embriones bovinos obtenidos in vitro.

6. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES OVINOS OBTENIDOS IN VIVO

6.1. INTRODUCCIÓN

Existen numerosos reportes de técnicas y protocolos de criopreservación de embriones de animales de interés agropecuario. La investigación ha sido enfocada principalmente sobre embriones bovinos (Edwards y col., 1997; Niemann, 1991), mientras que la criopreservación de los embriones de otras especies tales como cerdo (Hayashi y col., 1989; Kashiwazaki y col., 1991), caballo (Hochi y col., 1994; Skidmore y col., 1991; Slade y col., 1985) y cabra (Baril y col., 1988; Bilton y Moore, 1976; Chemineau y col., 1986; Li y col., 1990) es menos abundante. En 1976, fue reportado el primer nacimiento de un cordero a partir de un embrión congelado (Willadsen y col., 1976), y posteriormente se realizaron más investigaciones involucrando congelamiento lento con diferentes crioprotectores tales como glicerol (Cocero y col., 1988; Czlonkowska y col., 1992; Merry y col., 1984; Niemann, 1986; Sakul y col., 1993; Schiewe y col., 1991; Shelton, 1992; Smith y col., 1994; Tervit y Gold, 1984; Ware y Boland, 1987), propilenglicol (Schiewe y col., 1991; Somgsasen y col., 1995; Tervit y Gold, 1984), DMSO (Niemann, 1986; Somgsasen y col., 1995; Willadsen, 1977), etilenglicol (Cocero y col., 1988; Heyman y col., 1987; Mc Ginnis y col., 1993; Somgsasen y col., 1995; Tervit y Gold, 1984), metanol (Czlonkowska y col., 1991) y glicerol combinado con sacarosa (De Paz y col., 1994; Shelton, 1992). En 1990, se reportó el primer nacimiento de un cordero a partir de un embrión vitrificado (Széll y col., 1990). Se han obtenido buenos resultados empleando glicerol (Schiewe y col., 1991) o mezclas de propilenglicol y glicerol (De Paz y col., 1994; Széll y Windsor, 1994; Széll y col., 1990), glicerol y etilenglicol (Ali y Shelton, 1993a; Ali y Shelton, 1993b; Naitana y col., 1995; Széll y Windsor, 1994) y glicerol y sacarosa (Ali y Shelton, 1993). Una de las últimas soluciones de vitrificación desarrollada ha sido EFS, la cual ha sido

aplicada con éxito en embriones de ratón (Kasai y col., 1990), conejo (Kasai y col., 1992) y vacas (Mahmoudzadeh y col., 1993) pero aun no ha sido aplicada a embriones ovinos.

El objetivo del capítulo ha sido evaluar varias técnicas de criopreservación en su capacidad para mantener la viabilidad de los embriones ovinos obtenidos in vivo luego de ser criopreservados. En primer término se compararon protocolos de congelamiento lento y vitrificación mediante cultivo in vitro, y luego se evaluaron in vivo mediante transferencias. Se compararon dos crioprotectores (glicerol y etilenglicol) y dos métodos de remoción. También fueron comparadas dos soluciones de vitrificación.

6.2. RESULTADOS

Se recuperó un total de 1748 embriones de 278 donantes (6,3 embriones/donante), de los cuales 1320 fueron usados en estos experimentos y 428 no fueron considerados debido a su baja calidad.

6.2.1. Efecto del glicerol y del etilenglicol como crioprotectores en el congelamiento lento de embriones ovinos obtenidos in vivo

Se emplearon 200 embriones para comparar mediante cultivo in vitro la sobrevida embrionaria, 100 de los cuales fueron congelados con el protocolo Gli-3P y 100 con el protocolo Eg-3P. Se emplearon 240 embriones para comparar las tasas de preñez y de nacimientos, 80 de los cuales fueron congelados con el protocolo Gli-3P, 80 con el protocolo Eg-3P y 80 fueron transferidos en fresco como control.

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos Gli-3P y Eg-3P en las tasas de desarrollo y eclosión de las mórulas y los blastocistos ni en la suma de

ambos estadios. Tampoco hubo diferencias en la comparación de mórulas y blastocistos dentro de cada tratamiento (Tabla 1).

Los embriones criopreservados alcanzaron tasas de preñez y nacimientos menores que aquellos transferidos en fresco. En la comparación entre los dos crioprotectores, las mórulas congeladas con la solución Eg-3P mostraron mayores tasas de preñez y nacimientos que aquellas congeladas con Gli-3P, este efecto no fue observado en los blastocistos.

No hubo diferencias en la comparación entre mórulas y blastocistos dentro de cada tratamiento (Tabla 2).

6.2.2. Efecto de la cantidad de pasos de remoción del etilenglicol en el congelamiento lento de embriones ovinos obtenidos in vivo

Un total de 200 embriones fue empleado para comparar la sobrevida en cultivo in vitro, en 100 de los cuales el crioprotector fue removido en 3 pasos (Eg-3P) y en 100 en 1 paso (Eg-3Pm). Por otra parte, 240 embriones fueron empleados para comparar las tasas de preñez y nacimientos, en 80 de los cuales el crioprotector fue removido en 3 pasos (Eg-3P) y 80 en 1 paso (Eg-3Pm); 80 embriones fueron transferidos en fresco como control.

No hubo diferencias significativas en las tasas de desarrollo y de eclosión al comparar la remoción del crioprotector en 3 pasos y en 1 paso. Tampoco hubo diferencias en la comparación entre mórulas y blastocistos dentro de cada tratamiento (Tabla 3).

Las mórulas y la suma de mórulas y blastocistos criopreservados en ambos tratamiento mostraron tasas de preñez y nacimientos menores que aquellas transferidos en fresco. Mientras que en los blastocistos se encontraron diferencias significativas en la tasa de preñez pero no en la tasa de nacimientos con respecto al control.

No se encontraron diferencias en la comparación entre mórulas y blastocistos dentro de cada tratamiento (Tabla 4).

6.2.3. Efecto de dos soluciones de vitrificación en la sobrevida de embriones ovinos obtenidos in vivo

Un total de 200 embriones fue empleado para comparar la sobrevida mediante cultivo in vitro, 100 de los cuales fueron vitrificados empleando la solución Pg+Gli y 100 con EFS. Se emplearon 240 embriones vitrificados para comparar las tasas de preñez y de nacimientos, 80 de los cuales fueron vitrificados con la solución Pg+Gli y 80 con la solución EFS; 80 embriones fueron transferidos en fresco como control.

No hubo diferencias significativas en las tasas de desarrollo y eclosión de las mórulas y los blastocistos entre los tratamientos de vitrificación Pg+Gli y EFS. Tampoco se encontraron diferencias al comparar mórulas y blastocistos dentro de cada tratamiento (Tabla 5).

La solución EFS fue más efectiva en la criopreservación de las mórulas que la solución Pg+Gli, alcanzando valores de preñez y nacimientos comparables con aquellos alcanzados por las mórulas transferidas en fresco. Este efecto no fue observado en los blastocistos ni en la suma de mórulas y blastocistos, en los cuales Pg+Gli y EFS fueron igualmente efectivos y alcanzaron valores menores que los obtenidos por los blastocistos transferidos en fresco (Tabla 6).

Tabla 1. Tasas de desarrollo y eclosión de embriones ovinos congelados con los protocolos Gli-3P y Eg-3P.

		Tratamientos	
		Gli-3P	Eg-3P
Desarrollo	M	30/50 (60,0%)[a]	40/50 (80,0%)[a]
	B	40/50 (80,0%)[a]	36/50 (72,0%)[a]
	M + B	70/100 (70,0%)[a]	76/100 (76,0%)[a]
Eclosión	M	20/50 (40,0%)[a]	26/50 (52,0%)[a]
	B	28/50 (56,0%)[a]	26/50 (52,0%)[a]
	M + B	48/100 (48,0%)[a]	52/100 (52,0%)[a]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Valores con superíndices distintos en la misma fila difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 2. Tasas de preñez y nacimientos de embriones ovinos, frescos o congelados con los protocolos Gli-3P y Eg-3P.

		Tratamientos		
		Glicerol	Etilenglicol	Frescos
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas / total de embriones)	M	11/40 (27,5%)[a]	22/40 (55,0%)[b]	38/40 (95,0%)[c]
	B	18/40 (45,0%)[a]	17/40 (42,5%)[a]	33/40 (82,5%)[b]
	M + B	29/80 (36,3%)[a]	39/80 (48,8%)[a]	71/80 (88,8%)[b]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas / embriones transferidos)	M	11/37 (29,7%)[a]	22/37 (59,4%)[b]	38/40 (95,0%)[c]
	B	18/35 (51,4%)[a]	17/39 (43,5%)[a]	33/40 (82,5%)[b]
	M + B	29/72 (40,2%)[a]	39/76 (51,3%)[a]	71/80 (88,8%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos / total de embriones)	M	10/40 (25,0%)[a]	21/40 (52,5%)[b]	35/40 (87,5%)[c]
	B	17/40 (42,5%)[a]	15/40 (37,5%)[a]	30/40 (75,0%)[b]
	M + B	27/80 (33,8%)[a]	36/80 (45,0%)[a]	65/80 (81,3%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Terneros nacidos / embriones transferidos)	M	10/37 (27,0%)[a]	21/37 (56,7%)[b]	35/40 (87,5%)[c]
	B	17/35 (48,5%)[a]	15/39 (38,4%)[a]	30/40 (75,0%)[b]
	M + B	27/72 (37,5%)[a]	36/76 (47,3%)[a]	65/80 (81,3%)[b]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Valores con superíndices distintos en la misma fila difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 3. Tasas de desarrollo y eclosión de embriones ovinos congelados con etilenglicol luego de la remoción del crioprotector en 1 ó 3 pasos

		Tratamientos	
		Eg-3P	Eg-3Pm
Desarrollo	M	37/50 (74,0%)[a]	29/50 (58,0%)[a]
	B	34/50 (68,0%)[a]	38/50 (76,0%)[a]
	M + B	71/100 (71,0%)[a]	67/100 (67,0%)[a]
Eclosión	M	21/50 (42,0%)[a]	15/50 (30,0%)[a]
	B	26/50 (52,0%)[a]	25/50 (50,0%)[a]
	M + B	47/100 (47,0%)[a]	40/100 (40,0%)[a]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Valores con superíndices distintos en la misma fila difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 4. Tasas de preñez y nacimientos de embriones ovinos congelados con etilenglicol luego de la remoción del crioprotector en 1 paso o en 3 pasos

		Tratamientos		
		Eg-3P	Eg-3Pm	Frescos
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas / total de embriones)	M	27/60 (45,0%)[a]	26/60 (43,3%)[a]	40/60 (66,7%)[b]
	B	18/40 (45,0%)[a]	18/40 (45,0%)[a]	30/40 (75,0%)[b]
	M + B	45/100 (45,0%)[a]	44/100 (44,0%)[a]	70/100 (70,0%)[b]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas / embriones transferidos)	M	27/58 (46,6%)[a]	26/57 (45,6%)[a]	40/60 (66,7%)[b]
	B	18/36 (50,0%)[a]	18/36 (50,0%)[a]	30/40 (75,0%)[b]
	M + B	45/94 (47,9%)[a]	44/93 (47,3%)[a]	70/100 (70,0%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos / total de embriones)	M	26/60 (43,3%)[a]	25/60 (41,7%)[a]	39/60 (65,0%)[b]
	B	18/40 (45,0%)[a]	17/40 (42,5%)[a]	25/40 (62,5%)[a]
	M + B	44/100 (44,0%)[a]	42/100 (42,0%)[a]	64/100 (64,0%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Terneros nacidos / embriones transferidos)	M	26/58 (44,8%)[a]	25/57 (43,9%)[a]	39/60 (65,0%)[b]
	B	18/36 (50,0%)[a]	17/36 (47,2%)[a]	25/40 (62,5%)[a]
	M + B	44/94 (46,8%)[a]	42/93 (45,2%)[a]	64/100 (64,0%)[b]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Valores con superíndices distintos en la misma fila difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 5. tasas de desarrollo y eclosión de embriones ovinos vitrificados con las soluciones Pg+Gli o EFS

		Tratamientos	
		Pg+Gli	EFS
Desarrollo	M	28/50 (56,0%)[a]	24/50 (48,0%)[a]
	B	30/50 (60,0%)[a]	30/50 (60,0%)[a]
	M + B	58/100 (58,0%)[a]	54/100 (54,0%)[a]
Eclosión	M	18/50 (36,0%)[a]	16/50 (32,0%)[a]
	B	16/50 (32,0%)[a]	14/50 (28,0%)[a]
	M + B	34/100 (34,0%)[a]	30/100 (30,0%)[a]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Valores con superíndices distintos en la misma fila difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 6. Tasas de preñez y nacimientos de embriones ovinos vitrificados con las soluciones Pg+Gli o EFS

		Tratamientos		
		Pg+Gli	EFS	Frescos
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas / total de embriones)	M	11/40 (27,5%)[a]	22/40 (55,0%)[b]	26/40 (65,0%)[b]
	B	11/40 (27,5%)[a]	11/40 (27,5%)[a]	33/40 (82,5%)[b]
	M + B	22/80 (27,5%)[a]	33/80 (41,3%)[a]	59/80 (73,8%)[b]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas / embriones transferidos)	M	11/39 (28,2%)[a]	22/39 (56,4%)[b]	26/40 (65,0%)[b]
	B	11/37 (29,7%)[a]	11/38 (29,0%)[a]	33/40 (82,5%)[b]
	M + B	22/76 (29,0%)[a]	33/77 (42,9%)[a]	59/80 (73,8%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos / total de embriones)	M	11/40 (27,5%)[a]	22/40 (55,0%)[b]	24/40 (60,0%)[b]
	B	10/40 (25,0%)[a]	10/40 (25,0%)[a]	28/40 (70,0%)[b]
	M + B	21/80 (26,3%)[a]	32/80 (40,0%)[a]	52/80 (65,0%)[b]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Terneros nacidos / embriones transferidos)	M	11/39 (28,2%)[a]	22/39 (56,4%)[b]	24/40 (60,0%)[b]
	B	10/37 (27,0%)[a]	10/38 (26,3%)[a]	28/40 (70,0%)[b]
	M + B	21/76 (27,6%)[a]	32/77 (41,6%)[a]	52/80 (65,0%)[b]

M = Mórulas, B = Blastocistos, M + B = Mórulas + Blastocistos

Valores con superíndices distintos en la misma fila difieren significativamente ($P<0,05$).

6.3. DISCUSIÓN

Hasta el presente han sido congelados y vitrificados en forma exitosa mórulas y blastocistos ovinos, y se han obtenido corderos normales luego de la transferencia, pero existen pocos reportes de tasas de preñez y nacimientos en programas de transferencia a gran escala (Heyman y col., 1987; Sakul y col., 1993). Es este estudio, usamos el cultivo in vitro post-descongelamiento como modelo para evaluar la sobrevida embrionaria. El etilenglicol mostró ser más efectivo que el glicerol para la criopreservación de mórulas. Las tasas de preñez y de nacimientos confirman estos hallazgos. Este efecto no se encontró en blastocistos.

De acuerdo a nuestros resultados, el etilenglicol mostr ser superior al glicerol como crioprotector para el congelamiento de embriones de oveja. Széll y col. (1989) y Somgsasen y col. (1995) encontraron una mayor permeabilidad del etilenglicol comparado con la del propilenglicol, glicerol y DMSO. Más aun, ellos encontraron una mejora en la sobrevida post-descongelamiento en los embriones tratados con etilenglicol. Nuestros resultados apoyan estos hallazgos anteriores. Resultados similares fueron observados en embriones bovinos (Voelkel y Hu, 1992) y con embriones obtenidos in vitro (Leibo y Loskutoff, 1993). Los resultados del Experimento 1 muestran un mejor comportamiento de las mórulas congeladas con etilenglicol comparada con las mismas congeladas con glicerol, pero este no fue el caso con los blastocistos. Las diferencias entre tratamientos para las mórulas podrían ser explicadas por las diferencias en la permeabilidad asociada con los crioprotectores en los estadios tempranos de desarrollo embrionario (Széll y col., 1989).

No se detectaron diferencias en las evaluaciones in vitro o en las tasas de preñez y nacimientos entre los métodos de remoción del etilenglicol en 1 paso y en 3 pasos, lo cual indica que la remoción del crioprotector usando 1 o 3 pasos con sacarosa no es una etapa crítica para la sobrevida embrionaria.

El número óptimo de pasos de remoción del crioprotector y el tipo de solución de remoción es muy variado, pero en forma corriente las soluciones conteniendo

sacarosa son las preferidas. Resultados similares fueron obtenidos empleando 1 o más pasos de remoción del crioprotector con sacarosa (Cocero y col., 1988; Heyman y col., 1987; Mc Ginnis y col., 1993; Shelton, 1992; Tervit y Gold, 1984). Los mismos hallazgos fueron reportados con embriones bovinos (Voelkel y Hu, 1992).

Más allá de las diferencias entre los protocolos usados, las tasas de nacimientos observadas en los Experimentos 1 y 2 fueron similares a las tasas de nacimientos de corderos reportadas en otros estudios (Czlonkowska y col., 1992; Heyman y col., 1987; Mc Ginnis y col., 1993; Sakul y col., 1993; Tervit y Gold, 1984). Basados en los resultados presentados, el método de congelamiento con etilenglicol es el recomendado para las mórulas. Además, la remoción del crioprotector en 1 paso le agrega a este método simplicidad en el manejo.

No hubo diferencias entre las soluciones de vitrificación en las evaluaciones in vitro. Sin embargo, surgieron diferencias cuando se compararon las tasas de preñez y nacimientos. Luego de la transferencia, las mórulas vitrificadas con la solución EFS mostraron mejor comportamiento que aquellas vitrificadas con Pg+Gli, alcanzando valores que se aproximaban a aquellos obtenidos con las mórulas que habían sido transferidas en fresco. Por otra parte, los blastocistos vitrificados por cualquiera de los dos métodos mostraron tasas de preñez y nacimientos más bajas que aquellos transferidos en fresco. Ocurrió lo mismo cuando se analizó el conjunto de todos los embriones (mórulas + blastocistos). Por lo tanto, la vitrificación alcanzó buenas tasas de preñez y nacimientos.

En estudios previos (De Paz y col., 1994), se obtuvieron bajas tasas de desarrollo in vitro cuando los embriones fueron expuestos a la solución Pg+Gli a temperatura ambiente (12 y 17%). Széll y col. (1990) obtuvieron una tasa de nacimientos de corderos de 18,5% luego de la exposición de los embriones a dicha solución entre 4 y 12ºC, y Széll y Windsor (1994) reportaron tasas de nacimientos de 52% usando la misma metodología. Nuestros resultados mostraron una tasa de nacimientos de corderos del 26,5% empleando el mismo método.

Previamente, la solución EFS ha sido usada como agente de vitrificación en embriones de ratón (Kasai y col., 1990), conejo (Kasai y col., 1992) y vacas (Mahmoudzadeh y col., 1993), pero este es el primer trabajo en el que ha sido empleada con embriones de oveja. Los presentes hallazgos muestran resultados aceptables tanto en las evaluaciones in vitro como en las tasa de nacimientos.

Mientras que ambos agentes de vitrificación mostraron buenos resultados bajo condiciones de campo, donde las instalaciones de un laboratorio y el suministro de energía son limitados, la solución EFS tiene la ventaja de no requerir ningún paso a baja temperatura previo a la vitrificación (4 a 12ºC). Por lo tanto, este método resultó de más fácil aplicación en las condiciones antes mencionadas.

Por otra parte, observamos una menor proporción en la relación tasa de nacimientos/tasa de preñez entre los embriones transferidos en fresco que entre los criopreservados. Esto podría ser debido al hecho de que la criopreservación implica una forma de selección de los embriones con mejor viabilidad, mientras que tal selección no ocurre con los embriones transferidos en fresco, los cuales podría tener defectos sutiles no observados en nuestro estudio.

Finalmente, nuestros hallazgos muestran que el uso del etilenglicol como crioprotector y la remoción de este en un paso con sacarosa es el protocolo más adecuado para la criopreservación de embriones ovinos. La vitrificación de embriones ovinos alcanzó buenos resultados en términos de tasas de nacimientos, y EFS fue un agente de vitrificación aceptable para los embriones ovinos.

7. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES OVINOS OBTENIDOS IN VITRO

7.1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de los embriones obtenidos in vitro es más compleja que la de los obtenidos in vivo (Massip y col., 1995). Se ha sugerido que la menor viabilidad luego del congelamiento de los embriones obtenidos in vitro con respecto a los embriones obtenidos in vivo deriva de diferencias fisiológicas, morfológicas y bioquímicas entre ambos grupos (Greve y col., 1993; Massip y col., 1995). No obstante, se han producido avances significativos en la criopreservación de los embriones obtenidos in vitro (Dinnyes y col., 1999; Kaidi y col., 2000; Sommerfeld y Niemann, 1999).

Varios estudios han reportado el nacimiento de corderos luego de la transferencia en fresco de embriones obtenidos in vitro (Brown y Radziewic, 1998; Catt y col., 1997; Cheng y col., 1986; Cognie y col., 1991; Crozet y col., 1987; Holm y col., 1996; Ledda y col., 1999; Thompson y col., 1995), pero los datos relacionados con la criopreservación de estos embriones son relativamente escasos. Estos trabajos generalmente usan el congelamiento lento convencional o métodos de vitrificación, y, en todos los casos, fueron transferidos 2 ó más embriones por receptora (Dattena y col., 2000 y 2004; Earl y col., 1996; Papadopoulos y col., 2002; Ptak y col., 1999; Songsasen y col., 1996). Los reportes con respecto a las tasas de sobrevida luego de la transferencia de embriones ovinos obtenidos in vivo e in vitro criopreservados son escasos.

El objetivo del capítulo ha sido comparar varias técnicas de criopreservación en su capacidad para mantener la viabilidad de los embriones ovinos obtenidos in vitro y criopreservados. Se evaluó la sobrevida in vitro de los embriones luego de la criopreservación con protocolos de congelamiento lento y de vitrificación.

Finalmente se evaluó la sobrevida embrionaria luego de la criopreservación mediante transferencias.

7.2. RESULTADOS

Se procesó un total de 3970 oocitos, de los cuales clivaron luego de la fertilización 3124 (78,7%) y 1009 de ellos alcanzaron el estadio de blastocisto (32,3%). En los experimentos se empleó un total de 710 blastocistos, y 299 no fueron incluidos en los experimentos debido de su mala calidad.

7.2.1. Efecto del congelamiento lento con glicerol y etilenglicol sobre embriones ovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 100 embriones para comparar mediante cultivo in vitro las tasas de desarrollo embrionario y de eclosión y el número de núcleos. De ellos, 50 fueron congelados con el protocolo Gli-3P y 50 con el protocolo Eg-3P.

No hubo diferencias significativas en las tasas de desarrollo de los embriones empleando ambos crioprotectores. Sin embargo, la tasa de eclosión y el promedio del número de núcleos fueron más altos en el tratamiento Eg-3P que en el Gli-3P (Tabla 1).

7.2.2. Efecto de la vitrificación con las soluciones Pg+Gli y EFS en la sobrevida in vitro de embriones ovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 90 embriones para comparar mediante cultivo in vitro las tasas de desarrollo embrionario y de eclosión y el número de núcleos. De ellos, 45 fueron vitrificados con la solución de vitrificación Pg+Gli y 45 con la solución EFS.

No hubo diferencias en las tasas de desarrollo embrionario entre las soluciones crioprotectoras usadas. Sin embargo, EFS mostró una mayor tasa de eclosión y número promedio de núcleos que el tratamiento Pg+Gli (Tabla 2).

7.2.3. Efecto de la vitrificación con las soluciones EFS y Eg+Gli en la sobrevida in vitro de embriones ovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 110 embriones para comparar mediante cultivo in vitro las tasas de desarrollo embrionario y de eclosión y el número de núcleos. De ellos, 55 fueron vitrificados con la solución de vitrificación EFS y 55 con la solución Eg+Gli.

Los embriones vitrificados con Eg+Gli tuvieron tasas de desarrollo y eclosión significativamente mayores y un mayor número promedio de núcleos que los blastocistos vitrificados con EFS (Tabla 3).

7.2.4. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la vitrificación sobre embriones ovinos obtenidos in vitro

Se emplearon 200 embriones, 50 de los cuales fueron vitrificados con Eg+Gli, 50 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 M, 50 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,3 M y 50 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,5 M.

La adición de sacarosa 0,1 M mostró una tendencia a una mayor eficiencia en la criopreservación, si bien las diferencias con los grupos Eg+Gli y Eg+Gli combinado con sacarosa 0,3 M no fueron significativas. La adición de sacarosa 0,5M mostró un efecto adverso, detectándose diferencias significativas con el grupo Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 M (Tabla 4).

7.2.5. Efecto del congelamiento lento y de la vitrificación en la sobrevida luego de la transferencia de embriones ovinos obtenidos in vitro

Se evaluó la sobrevida luego de la transferencia de 180 embriones obtenidos in vivo y 210 embriones obtenidos in vitro. Los embriones obtenidos in vivo fueron asignados de la siguiente manera: 60 fueron congelados con el protocolo Eg-3P, 60 fueron vitrificados con la solución Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M y 60 fueron transferidos en fresco como control. Los embriones obtenidos in vitro fueron asignados de la siguiente manera: 70 fueron congelados con el protocolo Eg-3P, 70 fueron vitrificados con la solución Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M y 70 fueron transferidos en fresco como control. Se registraron las tasas de preñez y nacimientos, la longitud de la gestación, el peso al nacer de los corderos y la proporción de sexos.

Las tasas de preñez y nacimientos de los embriones obtenidos in vivo transferidos en fresco fueron significativamente más altas que la de todos aquellos embriones sometidos a la criopreservación y que los embriones obtenidos in vitro transferidos en fresco. Además, todos los métodos de criopreservación registraron tasas de preñez y nacimientos similares entre si. Sólo los embriones obtenidos in vitro congelados con el protocolo Eg+3P mostraron una tasa de nacimientos menor que los embriones obtenidos in vivo congelados con el mismo protocolo (Tabla 5).

No hubo diferencias significativas en la longitud de la gestación y en la proporción de sexos entre tratamientos. Sin embargo, los corderos excepcionalmente grandes que resultaron a partir de la transferencia de embriones obtenidos in vitro, mostraron un peso promedio al nacer significativamente más alto que aquellos originados por embriones obtenidos in vivo (Tabla 6).

Hubo diferencias significativas en la incidencia de nacimientos asistidos y muerte perinatal entre los embriones obtenidos in vivo e in vitro (Tabla 7).

Tabla 1. Efecto de los métodos de congelamiento lento Gli-3P y Eg-3P sobre las tasas de desarrollo y de eclosión y el número de núcleos de embriones ovinos obtenidos in vitro

	Tratamientos	
	Gli-3P	Eg-3P
Desarrollo	27/50 (54,0%)[a]	25/50 (50,0%)[a]
Eclosión	10/50 (20,0%)[a]	20/50 (40,0%)[b]
Número de núcleos	118,5±19,5 [a]	135,4±20,7 [b]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados, y como el promedio del número de núcleos, con el desvío estandar. Los valores con superíndices distintos dentro de la fila difieren significativamente (P<0,05).

Tabla 2. Tasas de desarrollo y de eclosión y número de núcleos en embriones ovinos obtenidos in vitro vitrificados con Pg+Gli y EFS

	Tratamientos	
	Pg+Gli	EFS
Desarrollo	23/45 (51,1%)[a]	29/45 (64,4%)[a]
Eclosión	13/45 (28,9%)[a]	23/45 (51,1%)[b]
Número de núcleos	113,5±22,0 [a]	133,8±36,8 [b]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados, y como el promedio del número de núcleos, con el desvío estandar. Los valores con diferentes superíndices dentro de la fila difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 3. Tasas de desarrollo y de eclosión y número de núcleos de embriones ovinos obtenidos in vitro vitrificados con EFS y Eg+Gli

	Tratamientos	
	EFS	Eg+Gli
Desarrollo	36/55 (65,4%)[a]	48/55 (87,3%)[b]
Eclosión	30/55 (54,5%)[a]	42/55 (76,4%)[b]
Número de núcleos	113,1±14,1 [a]	135,7±34,5 [b]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados, y como el promedio del número de núcleos, con el desvío estandar. Los valores con diferentes superíndices dentro de la fila difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 4. Tasas de desarrollo y de eclosión y número de núcleos de embriones ovinos obtenidos in vitro vitrificados con Eg+Gli combinado con diferentes concentraciones de sacarosa

Concentración de sacarosa	0 M	0,1 M	0,3 M	0,5 M
Desarrollo	41/50 (82,0%)[ab]	46/50 (92,0%)[a]	42/50 (84,0%)[ab]	35/50 (70,0%)[b]
Eclosión	35/50 (70,0%)[ab]	37/50 (74,0%)[a]	36/50 (72,0%)[ab]	26/50 (52,0%)[b]
Número de núcleos	130,3±30,3 [a]	131,2±32,4 [a]	131,9±31,5 [a]	130,4±29,9 [a]

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocele/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados, y como el promedio del número de núcleos, con el desvío estandar. Los valores con diferentes superíndices dentro de la fila difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 5. Tasas de preñez y nacimientos luego de la transferencia de embriones ovinos obtenidos in vivo e in vitro, frescos y criopreservados

Origen del embrión	In vivo			In vitro		
Tratamientos	Fresco	Eg-3P	Eg+Gli + Sac 0,1	Fresco	Eg-3P	Eg+Gli + Sac 0,1
Tasa de preñez por embriones totales (Receptoras preñadas / total de embriones)	43/60 (71,7%)[a]	26/60 (43,3%)[bc]	23/60 (38,3%)[bc]	35/70 (50,0%)[b]	20/70 (28,6%)[c]	28/70 (40,0%)[bc]
Tasa de preñez por embriones transferidos (Receptoras preñadas / embriones transferidos)	43/60 (71,7%)[a]	26/56 (46,4%)[bc]	23/56 (41,1%)[bc]	35/70 (50,0%)[b]	20/65 (30,8%)[c]	28/66 (42,4%)[bc]
Tasa de nacimientos por embriones totales (Terneros nacidos / total de embriones)	43/60 (71,7%)[a]	24/60 (40,0%)[b]	21/60 (35,0%)[bc]	27/70 (38,6%)[b]	15/70 (21,4%)[c]	20/70 (28,6%)[bc]
Tasa de nacimientos por embriones transferidos (Terneros nacidos / embriones transferidos)	43/60 (71,7%)[a]	24/56 (42,9%)[b]	21/56 (37,5%)[bc]	27/70 (38,6%)[bc]	15/65 (23,1%)[c]	20/66 (30,3%)[bc]

Los valores con diferentes superíndices dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 6. Longitud de la gestación y peso al nacimiento y proporción de sexos luego de la transferencia de embriones ovinos obtenidos in vivo e in vitro, tanto frescos como criopreservados

Tratamientos	Origen de los embriones	Longitud de la gestación (días)	Peso al nacer (kg)	Proporción de sexos (m:h)
Frescos	In vivo	153,7±2,2 [a]	3,2±0,6 [a]	23:20 [a]
Eg-3P	In vivo	154,2±2,5 [a]	3,1±0,6 [a]	12:12 [a]
Eg+Gli + Sac 0,1 M	In vivo	152,3±2,5 [a]	3,3±0,6 [a]	10:11 [a]
Frescos	In vitro	155,9±2,3 [a]	5,5±0,5 [b]	12:15 [a]
Eg-3P	In vitro	152,5±2,5 [a]	4,9±0,4 [b]	7:8 [a]
Eg+Gli + Sac 0,1 M	In vitro	153,4±2,2 [a]	5,4±0,5 [b]	10:10 [a]

Los valores están expresados como los promedios del longitud de la gestación y peso al nacimiento, con el desvío estandar. Los valores con diferentes superíndices dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 7. Tasas de nacimientos asistidos y muerte perinatal de corderos luego de la transferencia de embriones ovinos obtenidos in vivo e in vitro

Origen de los embriones	Nacimientos asistidos	Muerte perinatal
Obtenidos in vivo	4/88 (4,6%)[a]	1/88 (1,1%)[a]
Obtenidos in vitro	11/62 (17,7%)[b]	6/62 (9,7%)[b]

Los valores están expresados como el cociente entre partos asistidos/total y muerte de corderos/total.
Los valores con diferentes superíndices dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

7.3. DISCUSIÓN

Los diferentes protocolos de criopreservación evaluados en términos de sobrevida embrionaria in vitro, tasas de preñez y nacimientos, tuvieron en general resultados aceptables. En contraste con trabajos realizados previamente (Dattena y col., 2000; Dattena y col., 2004; Earl y col., 1996; Leon y col., 2002; Papadopoulos y col., 2002; Ptak y col., 1999; Songsasen y col., 1996) en los cuales se transfirieron 2 o más embriones criopreservados por receptora, en todos los experimentos del presente estudio se transfirió solamente un embrión por receptora reproduciendo más fielmente las condiciones de un sistema productivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Experimento 1, el etilenglicol fue superior al glicerol como crioprotector para el congelamiento de embriones ovinos obtenidos in vitro. Como ya fuera discutido en capítulos anteriores de esta tesis Széll y col. (1989) y Songsasen y col. (1995), encontraron que el etilenglicol es más permeable en la membrana celular que el propilenglicol, el glicerol y el DMSO. Además, se registró un incremento en la sobrevida post-descongelamiento en los embriones tratados con etilenglicol. Los resultados obtenidos respaldan estos hallazgos previos. Por otra parte se encontraron resultados similares con embriones bovinos obtenidos in vitro (Leibo y Loskutoff, 1993) y con embriones ovinos obtenidos in vivo (Cocero y col., 2002).

En el Experimento 2, la solución EFS fue superior a la solución Pg+Gli, de acuerdo a los resultados obtenidos para la tasa de eclosión y el número promedio de núcleos. Este hecho podría ser explicado por la mayor permeabilidad del etilenglicol hacia el interior de las células de los blastocistos, comparado con el propilenglicol y el glicerol (Palasz y Mapletoft, 1996). Además, la sacarosa y el Ficoll 70 (crioprotectores no permeables) confieren un efecto protector adicional al EFS, mientras que Pg+Gli no contiene en su composición crioprotectores no permeables en su formulación. La sacarosa causa la deshidratación del embrión, por lo que reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular y concentra las macromoléculas en el citoplasma lo que facilita la vitrificación intracelular

(Rall, 1987). El uso de una macromolécula tal como el Ficoll 70 facilita la vitrificación y previene la formación extracelular de hielo durante la vitrificación y el descongelamiento (Fahy y col., 1984; Kasai y col., 1990).

El Experimento 3 mostró que los embriones criopreservados con EFS tuvieron menores tasas de desarrollo y eclosión, y menor número promedio de núcleos que Eg+Gli. Esta diferencia parece estar relacionada con el número de pasos de equilibrado y/o las concentraciones de crioprotector más que con la combinación de crioprotectores. Esta hipótesis es apoyada por trabajos previos, donde se encontró que un incremento en el número de pasos de equilibrado antes de la inmersión final en la solución de vitrificación resultó en un incremento en la sobrevida embrionaria después del calentamiento (Darvedil y col., 1994; Kuwayama y col., 1992; Mahmoudzadeh y col., 1995; Ohboshi y col., 1997).

Las diferencias en el número de núcleos coinciden con las diferencias en las tasas de eclosión. Los métodos que producen las tasas de eclosión más altas, también muestran los números promedios de núcleos más altos. Esta asociación entre sobrevida embrionaria y número de núcleos podría ser muy útil para predecir la capacidad de implantación del embrión para una técnica dada. Esta hipótesis esta siendo investigada en la actualidad.

En el Experimento 4 no se encontraron diferencias en las tasas de desarrollo y eclosión entre los tratamientos en los que se usó la solución Eg+Gli sin sacarosa o combinada con sacarosa 0,1 y 0,3 M. La solución Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M mostró tasas de desarrollo y eclosión mayores que la solución Eg+Gli con sacarosa 0,5 M.

Si bien la sacarosa confiere un efecto protector adicional y facilita la vitrificación intracelular (Rall, 1987), sólo el uso de bajas concentraciones de sacarosa (0,1 y 0,3 M) tiene un efecto positivo, por cuanto una concentración más alta (0,5 M) resultó en tasas de éxito menores, lo cual sugiere que el uso de concentraciones altas de sacarosa como un buffer osmótico tiene efectos adversos sobre los embriones criopreservados (Leibo, 1984; McWilliams y col., 1991; Somgsasen y col., 1995; Széll y Shelton, 1986).

Estos resultados llevaron a transferir embriones luego del congelamiento con Eg-3P y luego de la vitrificación con Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M.

Las tasas de preñez y de nacimientos luego de la transferencia de embriones obtenidos in vivo en fresco fueron marcadamente más altas que aquellas obtenidas con los otros tratamientos, lo cual fue esperable ya que estos embriones son más robustos que su contraparte producidos por maduración in vitro, y no fueron sometidos a la criopreservación. Esto coincidió con trabajos previos donde se observaron diferencias entre los embriones obtenidos in vivo e in vitro, tanto frescos como criopreservados (Greve y col., 1993; Massip y col., 1995; Pollard y Leibo, 1994).

Los embriones obtenidos in vitro congelados con la solución Eg-3P tuvieron las tasas de preñez y nacimientos más bajas, mostrando que los embriones obtenidos in vitro son particularmente sensibles a este método de congelamiento. Esto no fue observado con la solución de vitrificación Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M, o cuando los embriones obtenidos in vivo fueron congelados con Eg-3P. Estos resultados coinciden con trabajos previos con embriones bovinos (Massip y col., 1995; Tachikawa y col., 1993).

En todos los tratamientos se registró la pérdida de preñeces como la diferencia entre la tasa de preñez y la tasa de nacimientos. Más allá de que las tasas de implantación fueron similares entre tratamientos, en los embriones obtenidos in vitro fue observada una mayor pérdida que en los embriones obtenidos in vivo, sin importar el tratamiento empleado. Esto coincide con trabajos realizados en bovinos, donde no solo se observaron tasas de preñez más bajas, sino que, además, se registraron altas tasas de pérdida fetal cuando se compararon embriones obtenidos in vivo con embriones obtenidos in vitro (Greve y col., 1993; Hasler y col., 1995; Massip y col., 1995; Wright y Ellington, 1995).

El peso al nacer de los corderos provenientes de embriones obtenidos in vitro fue mayor que el de aquellos originados a partir de embriones obtenidos in vivo, un efecto que no es atribuible a diferencias en la genética de las ovejas empleadas. Este incremento en el peso al nacimiento condujo al subsecuente incremento

significativo en los partos dificultosos que necesitaron ser asistidos y en la mortalidad perinatal. Este hecho ha sido reportado previamente en ovinos y bovinos, y se lo ha relacionado con el uso de suero en el medio de cultivo, o a algún otro factor aun desconocido del proceso de producción in vitro (Farin y Farin, 1997; Holm y col., 1996; Thompson, 1997; Walker y col., 1996).

No hubo diferencias en la proporción de sexos entre los corderos nacidos. Esto coincide con los resultados presentados por Catt y col. (1997), quienes, más allá de encontrar una mayor proporción de machos en los embriones ovinos obtenidos in vitro que alcanzaban el estadio de blastocisto, no encontraron diferencias en el momento del nacimiento.

Estos resultados demuestran que la transferencia de embriones ovinos obtenidos in vitro vitrificados con Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M podría ser un procedimiento factible para un programa comercial a gran escala siempre que el problema de los partos distócicos debido al mayor tamaño fetal pueda ser solucionado, ya que la obtención de corderos inusualmente grandes es un factor limitante para el empleo de este tipo de embriones. Esto sería particularmente crítico en áreas en las que se aplica un manejo extensivo de los rebaños.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Como conclusión de los resultados obtenidos durante el trabajo experimental de la presente tesis podemos decir que:

- Las soluciones de criopreservación formuladas con etilenglicol tienen mayor habilidad para conservar los embriones que aquellas que contienen glicerol o propilenglicol. Esto se debe a que el etilenglicol tiene mayor permeabilidad a través de la membrana plasmática.

- El agregado de bajas concentraciones de sacarosa (0,1 M) tanto en las soluciones de incorporación como en las de remoción del crioprotector tiene un efecto beneficioso. Este efecto se revierte con concentraciones altas de sacarosa.

- La transferencia directa de embriones bovinos producidos in vivo es un método que permite alcanzar tasas de éxito similares a los métodos que involucran varios pasos de remoción en laboratorio. Esto, sumado a su simplicidad, lo hace un método muy útil para ser aplicado en condiciones de campo.

- La vitrificación, tanto de embriones bovinos como ovinos, es un método aceptable con resultados comparables a los del congelamiento lento convencional.

- Los embriones producidos in vitro tienen tasas de éxito menores que los producidos in vivo. Por otra parte, los terneros y los corderos tienen mayor peso al nacimiento, lo cual provoca un aumento en los partos distócicos. Ambas condiciones hacen que el empleo de estos embriones en sistemas productivos se vea limitado.

- La evidencia obtenida en este trabajo nos permitió adaptar los protocolos de criopreservación para cada especie y tipo de embrión estudiado, logrando obtener la máxima eficiencia en el proceso de criopreservación con las herramientas disponibles en la actualidad:
  - Embriones bovinos producidos in vivo

    - Congelamiento con etilenglicol 1,5 M. Incorporación en 1 paso y transferencia directa (Eg-TrDir)
  - Embriones bovinos producidos in vitro

    - Congelamiento con etilenglicol 1,5 M. Incorporación en 1 paso y transferencia directa (Eg-TrDir)

    - Vitrificación con la solución etilenglicol 25% y glicerol 25% combinado con sacarosa 0,1 M (Eg+Gli + Sacarosa 0,1 M)
  - Embriones ovinos producidos in vivo

    - Congelamiento con etilenglicol 1,5 M. Incorporación en 3 pasos y remoción en 1 paso (Eg-3Pm)

    - Vitrificación con la solución etilenglicol 40%, Ficoll 70 18% y sacarosas 0,3 M (EFS)
  - Embriones ovinos producidos in vitro

    - Congelamiento con etilenglicol 1,5 M. Incorporación en 3 pasos y remoción en 3 pasos (Eg-3P)

    - Vitrificación con la solución etilenglicol 25% y glicerol 25% combinado con sacarosa 0,1 M (Eg+Gli + Sacarosa 0,1 M)

Lic. Alejandro Gustavo Martínez **Dr. Marcelo Antonio de las Heras**

9. PUBLICACIONES

Los resultados de la presente tesis fueron publicados en las siguientes revistas:

- Martínez AG, Matkovic M. Cryopreservation of ovine embryos: Slow freezing and vitrification. Theriogenology 1997; 49: 1039-1049.

- Martínez AG, de Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in-vitro produced bovine embryos. Theriogenology 1998; 50: 757-767.

- Martínez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, de las Heras MA. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: A field trial. Theriogenology 2002; 58: 963-972.

- Martínez AG, Valcárcel A, de las Heras MA, de Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. Animal Reproduction Science 2002; 73: 11-21.

- Martínez AG, Valcárcel A, Furnus CC, de Matos DG, Iorio GA, de las Heras MA. Cryopreservation of in vitro produced ovine embryos. Small Ruminant Research 2006; 63: 288-296.

10. BIBLIOGRAFÍA

Agca Y, Monson RL, Northey DL, Schaefer DM, Rutledge JJ. Post-thaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen in-vitro produced bovine embryos. Therigenology 1996, 45: 175 abstr.

Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1993, 99: 471-477.

Ali J, Shelton JN. Successful vitrification of Day-6 sheep embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1993, 99: 65-70.

Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds). Low Temperature Preservation in Medicine and Biology, Pitman Press, Bath, 1980.

Baldassarre H, Aste F, Argerich MC, de Matos DG. Comparative study between human menopausic gonadotrophin (HMG) and hipofisiary follicle stimulating hormone (FSH-P) for superovulation in sheep. Proceeding of 12th International Congress of Animal Reproduction, Dublin, 1992, 1: 182-183 abstr.

Baldassarre H, Furnus CC, de Matos DG, Pessi H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. Theriogenology 1996, 45: 707-717.

Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet JC. Embryo production, freezing and transfer in angora, alpine and saanen goats. Proceeding 4th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Lyon, 1988, 67-93.

Baril G, Vallet JC.Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. Theriogenology 1990, 34: 303-311.

Barnes FL, First NL. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. Molecular Reproduction and Development 1991, 29: 117-123.

Bavister BD, Rose-Hellekant TA. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. Theriogenology 1992, 37: 127-146.

Betteridge KJ, Flechon JE. The anatomy and physiology of preattachment bovine embryos. Theriogenology 1988, 29: 155-187.

Betteridge KJ. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. Animal Reproduction Science 2003, 79: 203–244.

Biery KA, Seidel GEJr, Elsden RP. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. Theriogenology 1986, 25: 140 abstr.

Biggers JD. In vitro fertilization and embryo transfer in historical perspective. In: Trounson AO, Wood C (eds.), In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Churchill Livingstone, London, 1984, 3–15.

Bilodeau-Goeseels S, Panich P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. Animal Reproduction Science 2002, 71: 143-155.

Bilton RJ, Moore NW. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. Australian Journall of Biology Science 1976, 29: 125-129.

Boland MP, Goulding D, Roche JF. Alternative gonadotrophin for superovulation in cattle. Theriogenology 1991, 35: 5-17.

Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A, de Kruif A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. Theriogenology 1995a, 43: 677-687.

Bongso A, Ng S, Sathananthan H, Lee M, Wong P, Ratnam S. Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultra-rapid

methods using two different cryoprotectants. Fertility and Sterility 1988, 49: 908.

Brackett BG, Younis I, Fayrer-Hosken RA. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. Fertility and Sterility 1989, 52: 319-324.

Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 1993, 39: 43-64.

Brandts JF. Thermodynamics of protein denaturation. I. The denaturation of Chymotrypsinogen. Journal of American Chemistry Society 1964, 86: 4291-4301.

Broadbent PJ, Stewart M, Dolman DF. Recipient management and embryo transfer. Theriogenology 1991, 35: 125-139.

Brown BW, Radziewic T. Production of sheep embryos in vitro and development of progeny following single and twin embryo transfers. Theriogenology 1998, 49: 1525-1536.

Camous S, Heyman Y, Meziou W, Ménézo Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. Journal of Reproduction and Fertility 1984, 72: 479-485.

Camous S, Kopecny V, Fléchon JE. Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. Biology Cell 1986, 58: 195-200.

Catt SL, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans G. Effects of rate of development of in vitro produced ovine embryos on sex ratio and in vitro survival after embryo transfer. Theriogenology 1997, 48: 1369-1378.

Chemineau P, Procureur R, Cognie Y, Lefèvre PC, Locatelli A, Chupin D. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected

goat herd without bluetongue transmission. Theriogenology 1986, 26: 279-290.

Cheng WTK, Moor RM, Polge C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology 1986, 25: 146-149.

Chupin D. Applications pratiques du transfert d'embryons chez les bovins. Elev. et Insemination 1985, 206: 3-15.

Chupin D. Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. Coll. Societè Francaise Étude de la Fertilitè, Masson, Paris, 1988, 26: 213-232.

Cocero MJ, Díaz de la Espina SM, Aguilar B. Ultraestructural characteristics of fresh an frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. Biology of Reproduction 2002, 66: 1244-1258.

Cocero MJ, Procureur P, De La Fuente J, Chupin D. Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. Theriogenology 1988, 29: 238 abstr.

Cognie Y, Guerin Y, Guyader C, Poulin N, Crozet N. In vitro fertilization of sheep oocytes matured in vivo. Theriogenology 1991, 35: 393-400.

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. Biology of Reproduction 2000, 62: 1459-1465.

Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. Cryobiology 2001, 43: 89-105.

Crozet N, Huneau D, Desmedt V, Theron MC, Szollosi D, Torres S, Sevellec C. In vitro fertilization with normal development in the sheep. Gamete Research 1987, 16: 159-170.

Crozet N. Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. Journal of Reproduction and Fertility 1991, 43: 235-243.

Czlonkowska M, Eysymont U, Guszkiewicz A, Kossakowski M, Dziak A. Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. Molecular Reproduction and Development 1991, 30: 34-38.

Czlonkowska M, Papis K, Guszkiewicz A, Kossakowski M, Eysymont U. Freezing of sheep embryos in 3.0 M methanol. Cryo Letters 1991, 12: 11-16.

Czlonkowska M, Papis K, Guszkiewicz A, Kossakowski M. Survival of agar-protected sheep demi-embryos after freezing. Cryo Letters 1992, 13: 293-296.

Darvedil U, Gustafsson H, Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martínez H. Survival rate and ultrastructure of vitrified bovine in vitro and in vivo developed embryos. Acta Veterinary Scandinavian 1994, 35: 417-426.

Dattena M, Accardo C, Pilichi S, Isachenko V, Mara L, Chessa B, Cappai P. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. Theriogenology 2004, 62:481-93.

Dattena M, Ptak G, Loi P, Cappai P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced blastocysts. Theriogenology 2000, 53: 1511-1519.

De Loos F, Van Vliet C, Vin Maurik P, Kruip TAM. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Research 1989, 24: 197-204.

de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. Molecular Reproduction and Development 1995, 42: 432-436.

de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martínez AG, Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. Molecular Reproduction and Development 1996, 45:451-457.

De Paz P, Sanchez AJ, Fernandez JG, Carbajo M, Dominguez JC, Chamorro CA, Anel L. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. Theriogenology 1994, 42: 327-338.

Diancourt MA, Gougeon A, Royère D, Thibault Ch. Ovarian function, In: Thibault Ch, Levasseur MC, Hunter RHF (eds.), Reproduction in Mammals and Man, Editon Marketin, Paris, 1993, 281-306.

Dinnyès A, Carolan C, Lonergan P, Massip A, Mermillod P. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. Theriogenology 1996, 46: 1425-1439.

Dinnyès A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang XZ. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. Molecular Reproduction and Development 1999, 53: 318-324.

Driancourt M. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology 2001, 55: 1211-1239.

Earl CR, Rowe JP, Kelly JM, De Barro TM. Pregnacy rates for fresh and frozen ovine IVP embryos from juvenile and adult donors. Proceedings 13th International Congress of Animal Reproduction, Sidney, 1996, 18-17.

Edwards LJ, Batt PA, Gandolfi F, Gardner DK. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. Molecular Reproduction and Development 1997, 46: 146-154.

Edwards RG, Steptoe PC. The relevance of the frozen storage of human embryos. In Elliot K and Whelan J (eds.) The freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation Symposium 52, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977: 235-250.

Elder K, Dale B. Cryopreservation. In: In Vitro Fertilization. University Press, Cambridge, 2000: 192-227.

Elliot K, Whelan J (eds.). CIBA Fuondation Symposium 52, The Freezing of Mammalian Embryos, Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1977.

Elsden R, Seidel G, Takeda T, Farrand G. Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. Theriogenology 1982, 17: 1-10.

Evans ACO. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. Animal Reproduction Science 2003, 78: 289-306.

Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviduct tissue or in conditioned medium. Journal of Reproduction and Fertility 1989, 85: 715-720.

Fahning ML, García MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Cryobiology 1992, 29: 1-18.

Fahy GM, Mac Farlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 1984, 21: 407-426.

Fahy GM. Vitrification. In: Low Temperature Biotechnology: Emerging Applications and Engineering Contributions. McGrath JJ and Diller KR (eds.) BED vol. 10 / HTD vol. 98, 1989.

Farin PW, Farin CE. Perspectives on large calves following transfer of embryos produced in vitro. Embryo Transfer Newsletter 1997, 15: 15-19.

Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. Fertility and Sterility 1988, 49: 743-764.

Fukuda Y, Ichikawa M, Nalto K, Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. Biology of Reproduction 1990, 42: 114-119.

Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM. Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1988, 82: 337-340.

Fukui Y, Mc Gowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilize in vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1991, 92: 125-131.

Fukui Y, Sakuma YU. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biology of Reproduction 1980, 22: 669-673.

Fukui Y, Urakawa M, Sasaki C, Chikamatsu N, Otio H. Development to tile late morula or blastocyst stage following in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Animal Reproduction Science 1989, 18: 139-148.

Furnus C, de Matos D, Martínez AG, Matkovic M. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology 1997, 47: 481-490.

Furnus CC, de Matos DG, Martínez AG. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology 1998, 49: 1489-1499.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. Theriogenology 2003, 59: 599-616.

Gardner D, Lane M, Spitzer A, Batt P. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. Biology of Reproduction 1994, 50: 390-400.

Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology 1990, 33: 77-87.

Gordon I. Embryo transfer and associated techniques in cattle. In Gordon I (ed.): Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes, CAB International, University Press, Cambridge, 1996, 245-371.

Gordon I. Embryo transfer and associated techniques in goats. In Gordon I (ed.): Controlled Reproduction in Sheep and Goats, CAB International, University Press, Cambridge, 1997, 416-439.

Gordon I. Embryo transfer and associated techniques in sheep. In Gordon I (ed.): Controlled Reproduction in Sheep and Goats, CAB International, University Press, Cambridge, 1997, 280-329.

Green SH, Smith AU, Zuckerman S. The numbers of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing. Journal of Endocrinology 1956, 13: 330.

Greve T, Avery B, Callensen H. Viability of in-vivo and on vitro produced bovine embryos. Reproduction in Domestic Animals 1993, 28: 164-169.

Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. Animal Reproduction Science 1993a, 33: 51-69.

Greve T, Madison V. In vitro fertilization in cattle: A review. Reproduction, Nutrition and Development 1991, 31: 147-157.

Hall SJ, Ruane J. Livestocks breedes an their conservation: A global overview. Conservation Biology 1993, 7: 815-825.

Hare WCD, Luedke AJ, Thomas FG, Bowen RA, Singh EL, Eaglesome MD, Randall GCB, Bielansky A. Non-transmission of bluetongue virus by embryo transfer from bluetongue virus-infected sheep. American Journal of Veterinary Research 1988, 49: 468-472.

Hartman CG, Lewis WH, Miller FW, Sivett WW. First findings of tubal ova in the cow together with notes on estrus. Anatomical Records 1931, 48: 267-275.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 1995, 43: 141-152.

Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. Theriogenology 1997, 48: 563-579.

Hasler JF, McCauley AD, Lanthrop WF, Foote RH. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. Theriogenology 1987, 27: 139-168.

Hasler, JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. Animal Reproduction Science 2003, 73: 245-264.

Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K, Hirano S. Birth of piglets from frozen embryos. Veterinary Records 1989, 125: 43-44.

Heape W. Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. Procceddings of Royal Society of Biology 1897b, 62: 178–183.

Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. Procceddings of Royal Society of Biology 1891, 48: 457–458.

Heyman Y, Ménézo Y. Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos developing in vitro. In: The Mammalian Preimplantation Embryo. Bavister BD (ed.), Plenum Press, New York, 1987, 175-191.

Heyman Y, Vincent C, Garnier V, Cognie Y. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. Veterinary Records 1987, 120: 83-85.

Hochi S, Fujimoto T, Braum J, Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology 1994, 42: 483-488.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 1999, 52: 683-700.

Holm P, Walker S, Seamark R. Embryo viability duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. Journal of Reproduction and Fertility 1996, 107: 175-181.

Huneau D, Crozet N. In vitro fertilization in the sheep: effect of the elevated calcium concentration at insemination. Gamete Research 1989, 23: 119-125.

Hyttel P, Greve T, Callensen H. A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes. Anatomical Embryology 1989b, 179: 435-442.

Hyttel P, Greve T, Callensen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. Journal of Reproduction and Fertility 1989a, 38: 35-47.

Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. Journal of Veterinary Medicine Science 2002, 64:887-891.

Iwasaki S, Hamano S, Kuwayama M, Yamashita M, Ushijama H, Nagaoka S, Nakahara T. Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized in vitro. The Journal of Experimental Zoology 1992, 261: 79-85.

Iwasaki S, Yoshiba N, Ushijima H, Watanabe S, Nakagata T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. Journal of Reproduction and Fertility 1990, 90: 279-284.

Jackowski S, Leibo SP, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. Journal of Experimental Zoology 1980, 212: 329.

Kaidi S, Donnay I, Massip A, Dessy F, Lambert P. Osmotic behaviour of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. Cryobiology 2000, 41: 106-115

Kaidi S, Donnay I, Van Langendonckt A, Dessy F, Massip A. Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. Animal Reproduction Science 1998, 52: 39-50.

Kajihara Y, Blakewood EG, Myers MW, Kometani N, Goto K, Godke RA. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. Therlogenology 1991, 35: 220.

Kane MT. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. Animal Reproduction Science 2003, 79: 171-190.

Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biology of Reproduction 1992, 46: 1042-1046.

Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. Journal of Reproduction and Fertility 1990, 89: 91-97.

Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1981, 63: 175-180.

Kashiwazaki N, Ohtani S, Nagashima H, Yamakawa H, Cheng WTK, Lin AC, Ogawa S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196ºC. Theriogenology 1991, 35: 221 abstr.

Khurana N. Comparative aspects of the energy metabolism of bovine embryos from the oocyte to the hatched blastocyst derived in vitro and in vivo. PhD dissertation, Veterinary School, Hannover, Germany, 1992.

Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. Biology of Reproduction 2000, 62: 847-856.

King WA, Chartain I, Kopecny V, Betteridge KJ, Bergeron H. Nucleolus organizer regions and nucleoli in mammalian embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1989, 28: 63-71.

King WA. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. Canadian Vetrinary Journal 1991a, 32: 99-103.

Kobayashi K, Takagi Y, Satoh Y, Hoshi H, Oikawa T. Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cell. In Vitro Cellular Developmental Biology 1992, 28A: 255-259.

Kraemer DC. Embryo collection and transfer in small ruminants. Theriogenology 1989, 31:141-148.

Krisher, RL. The effect of oocyte quality on development. Journal of Animal Science 2004, 82(suppl.): E14–E23.

Kuwayama M, Hamano S, Nagai T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in-vitro culture of oocytes matured and fertilized in-vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1992, 96: 187-193.

Kvasnitski A. Interbreed ova transplantations. Animal Breeding 1951, 19: 224 abstr.

Lane M, Maybach JM, Hooper K, Hasler JF, Gardner DK. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. Molecular, Reproduction and Development 2003, 64:70-78.

Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. Production and lambing rate of blastocysts derived from in vitro matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes. Journal of Animal Science 1999, 77: 2234-2239.

Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. Journal of Animal Science 1979, 48: 76-86.

Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in-vitro-derived bovine embryos. Theriogenology 1993, 39: 81-94.

Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho EG. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. Cryobiology 1978, 15: 257.

Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology 1984, 21: 767-790.

Leibo SP. Equilibrium and nonequilibriuim cryopreservation of embryos. Theriogenology 1989, 31: 85-93.

Leibo SP. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. Journal of Membranes Biologics 1980, 53: 179.

Leon G, Bogliolo L, Berlinguer F, Rosati I, Pintus P, Ledda S, Naitana S. Defined media for Vitrificación, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. Cryobiology 2002, 45: 204-212

Li R, Cameron AWN, Batt PA, Trounson AO. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. Reproduction, Fertility and Development 1990, 2: 345-350.

Lindner GM, Wright RW. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 1984, 20: 407-415.

Liu Y, Wang S, Holyoak GR, Brunch TD. Survival rates of in vitro produced bovine embryos cryopreserved by controlled slow-freezing/fast-freezing/vitrification. Theriogenology 1996, 45: 177 abstr.

Lonergan P. Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. PhD thesis, National University of Ireland, Dublin, 1992.

Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. Nature 1959, 183: 1394-1395.

Lu KH, Gordon I, Gallagher M, Mc Govem H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Veterinary Records 1987, 121: 259-260.

Luyet BJ, Gehenio RM. Life and Death at Low Temperatures. Biodynamica, Normandy, MO, 1940.

Luyet BJ. The vitrification of organics colloids and of protoplasm. Biodynamica 1937, 1: 1-14.

Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, de Kruif A. 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. Journal of Reproduction and Fertility 1995, 103: 33-39.

Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Van Vlaenderen I, De Kruif A. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in-vitro survival of vitrified bovine embryos. Theriogenology 1993, 39: 1291-1302.

Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT, De Kruif A. Comparison of 2-step vitrification versus controlled freezing on survival of in-vitro produced cattle embryos. Theriogenology 1994, 42: 1389-1397.

Mannaerts BMJL. Cytological parameters for rating bovine embryo quality. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 1986, 34: 216-222.

Massip A, Leibo SP, Blesbois E. Criobiology of gametes and the breeding of domestic animals. In: Life in the frozen state, Fuller BJ, Lane N, Benson EE (eds) CRC Press, Boca Raton, Florida, 2004, 371-392.

Massip A, Mermillod P, Dinnyès A. Morphology and biochemistry if in vitro produced bovine embryos: Implications for their cryopreservation. Human Reproduction 1995, 10: 3004-3011.

Massip A, Mermillod P, Van Langendonckt A, Touze JL, Dessy F. Survival and viability of fresh and frozen thawed in vitro bovine blastocysts. Reproduction, Nutrition and Development 1995, 35: 3-10.

Massip A, Mermillod P, Wils C, Dessy F. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced in-vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1993, 97: 65-69.

Massip A, Van Der Zwalmen P, Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology 1987, 27: 69-79.

Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo Letters 1986, 7: 270-273.

Mazur P, Rall WF, Leibo SP. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Cell Biophysiology 1984, 6: 197.

Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. Fed. Proceedings 1965, 24: S175-S182.

Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. Cell Biophysiol 1990, 17: 53.

Mc Ginnis LK, Duplantis SC, Youngs CR. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. Animal Reproduction Science 1993, 30: 273-280.

Mc Laughlin KJ, Ashman RJ, Mc lean DM, Stevens G, Bartsch BD, Seamark RF. Viability of one cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct medium. Proceeding of Australian Society of Reproductive Biology 1989, 21: 36 abstr.

McCauley TC, Mazza MR, Didion BA, Mao J, Wu G, Coppola G, Coppola GF, Di Berardino D, Day BN. Chromosomal abnormalities in Day-6, in vitro-produced pig embryos. Theriogenology 2003, 60: 1569-1580.

McWilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP. Osmotic responses of mouse and human ova in permeating and nonpermeating solutes. Cryobiology 1991, 28: 523 abstr.

Mermillod P, Vansteenbrugoe A, Wils C, Mourmeaux J-L, Massip A, Dessy F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. Biology of Reproduction 1993, 49: 582-587.

Merry DA, Bondioli KR, Allen RL, Wright RW. One-step sucrose dilution of frozen-thawed sheep embryos. Theriogenology 1984, 22: 433-443.

Meryman HT. Foreword. In: Life in the frozen state. In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, eds., CRC Press, Londres, 2004, 1-4.

Miyamoto H, lshibashi T. Liquid nitrogen vapor freezing of mouse embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1986, 78: 471.

Moor RM, Seamark RF. Cell signaling, permeability, and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals. Journal of Dairy Science 1986, 69: 927-943.

Nagai T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. Theriogenology 2001, 55: 1291-1301.

Naitana S, Dattena M, Gallus M, Loi P, Branca A, Ledda S, Cappai P. Recipient synchronization affects viability of vitrified ovine blastocysts. Theriogenology 1995, 43: 1371-1378.

Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. Theriogenology 2004, 62:437-449

Nicholas JS. Development of transplanted rat eggs. Procceding of Society of Experimental Biology and Medicine 1933, 30: 1111–1113.

Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. Theriogenology 1991, 35: 109-124.

Niemann H. Recent results of freezing experiments with embryos from farm animals. In: Menezo Y, Merieux Ch (eds.), Worshop on Embryo and Oocytes Freezing, Collection Foundation Merieux, Lyon, 1986, 195-204.

Oguri N, Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares. Journal of Reproduction and Fertility 1974, 41: 313–320.

Ohboshi S, Etoh T, Sakamoto K, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H. Effects of bovine serum proteins in culture medium on post-warming survival of bovine blastocysts developed in vitro. Theriogenology 1997, 47: 1237-1244.

Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro derived bovine blastocysts. Animal Reproduction Science 1997, 48: 27-36.

Palasz AT, Gustafsson H, Rodriguez-Martínez H, Gusta L, Larsson B, Mapletoft RJ. Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. Theriogenology 1997, 47: 865-879.

Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. Biotechnologies Advances 1996, 14: 127-149.

Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, Lonergan P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro-produced ovine blastocysts. Animal Reproduction Science 2002, 74: 35-44.

Parrish J, Susko-Parrish J, Handrow R, Sims M, First N. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biology of Reproduction 1989, 40: 1020-1025.

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NF. Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. Theriogenology 1986, 25: 591-600.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biology of Reproduction 1988, 38: 1171-1180.

Parrott DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. Journal of Reproduction and Fertility 1960, 1: 230.

Pavlok A, Motlik J, Kanka J, Fulka J. In vitro techniques of bovine oocyte maturation, fertilization and embryo culture resulting in the birth of a calf. Reproduction, Nutrition and Development 1989, 29: 611-616.

Peterson AJ, Lee RSF. Improving successful pregnancies after embryo transfer. Theriogenology 2003, 59: 687-697.

Picard L, King WA, Betteridge KJ. Production of sexed calves from frozen bovine embryos. Veterinary Records 1985, 117: 608–610.

Plante L, King WA. Light and electron microscopic analysis of bovine embryo derived by in vitro and in vivo fertilization. Journal of Assisted Reproduction & Genetic 1995 (in press).

Plante L, Plante C, Shepherd DL, King WA. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. Molecular Reproduction and Development 1994, 39: 375-383.

Polge C, Rowson LEA. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -7ºC. Nature 1952, 169: 626-627.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949, 164, 666.

Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology 1994, 41: 101-106.

Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biology of Reproduction 1987, 37: 859–866.

Prather RS, First NL. Cell-to-cell coupling in early-stage bovine embryo: A preliminary report. Theriogenology 1993, 39: 561-567.

Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. Biology of Reproduction 1989, 41: 414–418.

Prather RS, Spire MF, Schalles RR. Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. Theriogenology 1987, 28: 195-204.

Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M, Cappai P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production vitrification and birth of offspring. Theriogenology 1999, 15: 1105-1114.

Pugh P, Ankersmit A, Mc Gowan L, Tervit H. Cryopreservation of in-vitro bovine embryos: Effect of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. Theriogenology 1998, 50: 495-506.

Rall W, Wood M, Kirby C, Whittingham D. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Journal of Reproduction and Fertility 1987, 80: 499.

Rall WF, Fahy CM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196ºC by vitrification. Nature 1985, 313: 573-575.

Rall WF. Cryopreservation of mammalian embryos, gametes, and ovarian tissues. In: Contemporary Endocrinology: Assited Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals, Wolf, DP, Zelinski-Wooten M (eds.), Human Press, Towata, NJ, 2001, 173-187.

Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1987, 24: 387-402.

Reichenbach HD, Liebrich J, Berg U, Brem G. Pregnancy rates and birth after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1992a, 95: 363-370.

Reinthaller A, Kainz Ch, Deutinger J, Bieglmayer Ch. Development of mouse embryos following conventional and ultra-rapid cryopreservation. Archives of Gynecology and Obstetics 1988, 244: 33.

Renard J, Heyman Y, Leymonie P, Plat J. Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. Theriogenology 1983, 19: 145 abstr.

Rieger D, Betteridge KJ. Principles and practice embryo culture. Proceedings of the 8th Annual Meeting of the American Embryo Transfer Association, Nashville, Tennessee, 1989, 1: 98-107.

Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. Reproduction, Fertility and Development 1992, 4: 547-557.

Rieger D, Loskutoff NM. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1994, 100: 257-262.

Rieger D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. Theriogenology 1992, 37: 75-94.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger rna expression. Biology of Reproduction 2003, 68: 236-243.

Rose TA, Bavister BD. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. Molecular Reproduction and Development 1992, 31: 72-77.

Rubio Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, Roelen BAJ. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. Theriogenology 2005, 63: 2254-2268.

Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol trehalose and polyvinylpyrrolidone. Cryobiology 1996, 33: 291-299.

Saha S, Suzuki T. Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three step addition of cryoprotective additives. Reproduction, Fertility and Development 1997, 9: 741-746.

Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in-vitro. Theriogenology 1994, 41: 1053-1060.

Sakul H, Bradford GE, Bondurant RH, Anderson GB, Donahue SE. Cryopreservation of embryos as means of germ plasm conservation in sheep. Theriogenology 1993, 39: 401-409.

Scheffen B, Van der Zwalmen P, Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo Letters 1986, 7: 260-269.

Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD, Wildt DE. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. Theriogenology 1991, 36: 279-293.

Schneider U, Mazur P. Implications and applications of the long-term preservation of embryos by freezing. Current Therapy in Theriogenology 1990, 2: 81-83.

Seidel G. Embryo transfer: The next 100 years. Theriogenology 1991, 35: 171-180.

Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, Gustari S, Bartolome J, Rodriguez-Martínez H. Compartive morphological evaluation of in vivo and in vitro produced bovine embryos. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction 1992, 3: 1333-1335.

Shaw JM, Diotallevi L, Trounson AO. A simple rapid dimethyl sulphoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. Reproduction, Fertility and Development 1991, 3: 621.

Shaw JM, Kola I, Mac Farlane DR, Trounson A. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. Journal of Reproduction and Fertility 1991, 91: 9.

Shelton JN. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. Theriogenology 1992, 37: 713-721.

Sirard MA, Lambert RD. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. Biology of Reproduction 1985, 33: 487-494.

Skidmore J, Boyle MS, Allen WR. A comparison of two different methods of freezing horse embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1991, 44: 714-716.

Skrzyszowska M, Smorag Z. Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. Theriogenolgy 1989, 32: 115-122.

Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsden RP, Seidel GE. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. Theriogenology 1985, 24: 45-58.

Smith AU. Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood cells. Lancet 1950, 2: 910-911.

Smith CL, Peter AT, Appell KM. Effects of stepwise cryodilution prior to freezing and stepwise post-thaw rehydration on viability of ovine embryos. Theriogenology 1994, 41: 1267-1271.

Somgsasen N, Buckrell BC, Plante C, Leibo SP. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. Cryobiology 1995, 32: 78-91.

Somgsasen N, Walmsley S, Pollard JW, Martino A, Buckrell BC, Leibo SP. Lambs produced from cryoprerved sheep embryos derived by in vitro fertilization of aspirated oocytes. Canadian Journal of Animal Science 1996, 76: 465-467.

Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. Cryobiology 1999, 38: 95-105.

Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. Biology of Reproduction 1997, 56: 483-488.

Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. Lancet 1976, I: 880-882.

Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biology of Reproduction 1988, 39: 657–664.

Stringfellow DA, Givens MD. Preventing disease transmission through the transfer of in-vivo-derived bovine embryos. Livestock Production Science 2000, 62: 237-251.

Suzuki T, Ishida T, Sakai Y. Cryopreservation of bovine embryos in medium with glycerol (1.4 M) and sucrose. Japanese Journal of Animal Reproduction 1989, 35: 125-129.

Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H, Ooe M. Pregnancy rate and survival in culture of in-vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. Theriogenology 1993, 40: 651-659.

Széll A, Shelton JN, Széll K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. Cryobiology 1989, 26: 297-301.

Szell A, Shelton JN. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1987, 80: 309.

Széll A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen. Journal of Reproduction and Fertility 1986, 76: 401-408.

Széll A, Zhang J, Hudson R. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180°C. Reproduction, Fertility and Development 1990, 2: 613-618.

Széll AZ, Windsor DP. Survival of vitrified sheep embryos in-vitro and in-vivo. Theriogenology 1994, 42: 881-889.

Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in-vitro maturation and fertilization. Molecular Reproduction and Development 1993, 34: 266-271.

Takada N, Ohisa N, Numabe T, Ishikawa Y. Conception rates after transfer of Japanese Black cattle embryos produced in vitro. Veterinary Records 1990, 126: 581-582.

Takahashi Y, Kanagawa H. Effect of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse morulae after rapid freezing. Molecular, Reproduction and Development 1990, 26: 105-110.

Tervit HR, Gold PG. Deep-freezing of sheep embryos. Theriogenology 1984, 21: 268 abstr.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture in vitro of sheep and catle ova. Journal of Reproduction and Fertility 1972, 30: 493-497.

Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF. Reproduction in mammals and man. Edition Marketing, Paris, 1993.

Thibier M, Guérin B. Embryo transfer in small ruminants: The method of choice for health control in germplasm exchanges. Livestock Production Science 2000, 63: 253-260.

Thibodeaux JK, Myers MW, Goodeaux LL, Ménézo Y, Roussel JD, Broussard JR, Godke RA. Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. Reproduction, Fertility and Development 1992, 4: 573-583.

Thinh NT, Takagi H, Yashima S. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of banana (*Musa spp.*) by vitrification method. Cryo-Letters 1999, 20: 163-174.

Thompson JG, Gardner DK, Pugh AP, Mc Millan WH, Tervit HR. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation

development of ovine embryos. Biology of Reproduction 1995, 53: 1385-1391.

Thompson JG. Comparison between in vivo derived and in vitro produced pre-elongation embryos from domestic ruminants (Review). Reproduction, Fertility and Developmentel 1997, 9: 341-354.

Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C. Ultra-rapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. Fertility and Sterility 1988, 49: 822.

Trounson A, Peura A, Kirby C. Ultra-rapid freezing: A new low cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertility and Sterility 1987, 48: 843.

Trounson A. Cryopreservation. British Medical Bulletin 1990, 46: 695.

Tsonev LI, Hirsh AG. Fluorescence ratio intrinsic basis states analysis: A novel approach to monitor and analyze protein unfolding by fluorescence. Journal of Biochemistry and Biophysics Methods 2000, 45: 1-21.

Ushijima M, Okuda T, Nakayama A, Moji K, Ishida K, Murata H, Iguchi A, Etoh T. Relationship between the cell number and quality of day-8 bovine blastocyst. Proceeding of the East Japanese Animal Embryo Transfer Society 1988, 9: 37-38.

Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo Letters 1997, 18: 191-195.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Factors affecting survival of in-vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. Animal Reproduction Science 1996, 45: 191-200.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Overall efficiency of in-vitro embryo production and vitrification in cattle. Theriogenology 1996, 45: 683-689.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in straw rehydration. Journal of Reproduction and Fertility 1997, 111: 65-70.

Vajta G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. Embryo Transfer Newsletter 1997, 15: 12-18.

Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R, Koninckx PR. Cryopreservation of pronucleate mouse ova: Slow versus ultra-rapid freezing. Human Reproduction 1990, 5: 619.

Van Soom A, de Kruif A. A comparative study of in vivo and in vitro derived bovine embryos. Proceedings 12th International Congress of Animal Reproduction 1992, 3: 1363-1365.

Van Soom A, Mitjen P, Van Vlaenderen I, Van den Branden J, Mahmoudzadeh AR, de Kruif A. Birth of double muscled Belgian blue calves after transfer of in vitro produced embryos into dairy cattle. Theriogenology 1994, 41: 855-867.

Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. Theriogenology 1992, 38: 905-919.

Van Wagtendonk-De Leeuw AM, Aerts BJG, Den Daas JHG. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos - A field study. Theriogenology 1998, 49: 883-894.

Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Dominguez V, Cocero MJ. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. Theriogenology 2005, 63: 1973-1983.

Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology 1992, 37: 23-37.

Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challeneges. Theriogenology 1996, 45: 111-120.

Ware CB, Boland MP. Effect of varying glycerol and sucrose concentrations combinations on embryo survival rate in a one-step cryoprotectant removal from frozen-thawed ovine embryos. Theriogenology 1987, 27: 721-728.

Warwick BL, Berry RO, Horlacher WR. Results of mating rams to Angora female goats. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the American Society of Animal Production 1934, 225–227.

Warwick BL, Berry RO. Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats. Journal of Heredity 1949, 40: 297–303.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to –196ºC and 269ºC. Science 1972, 178: 411-414.

Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee H, Halsey JA. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from –196ºC. Journal of Reproduction and Fertility 1979, 56: 11.

Whittingham DG. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In: The Freezing of Mammalian Embryos, Ciba Foundation Symposium, 1977, 52: 97-108.

Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM. Deep freezing of sheep embryos. Journal of Reproduction and Fertility 1976, 46: 151-154.

Willadsen SM. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce identical twins. Nature 1979, 277: 298–300.

Willadsen SM. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In: The freezing of the Mammalian Cells, Ellot K,

Whalan J (eds.), CIBA Foundation Symposium, Amsterdam, 1977, 52: 175-201.

Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 1986, 320: 63–65.

Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. Science 1951, 113: 247.

Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Veterinary Records 1973, 92: 686-690.

Wilmut L, Young P, De Sousa, King T. New opportunities in animal breeding and production - An introductory remark. Animal Reproduction Science 2000, 60-61: 5-14.

Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Science 1972, 11: 1071-1079.

Wilson L, Quinn P. Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. Human Reproduction 1989, 4: 86.

Winterberger Torres S, Sevellec C. Atlas of the Early Development of the Sheep Embryo, INRA Publications, Paris, 1987.

Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. Cryogiology 2001, 42:79-87.

Wright RW, Ellington J. Morphological and physiological differences between in vivo and in vitro produced preimplantation embryos from livestock species. Theriogenology 1995, 44: 1167-1189.

Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF, Kruip TAM. Developmental potential of in-vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. Theriogenology 1994, 42: 1275-1284.

Xu KR, Greve T, Callesen H, Hyttel P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. Journal of Reproduction and Fertility 1987, 81: 501-504.

Yamashita S, Satoh T, Hoshi H, Abe H, Itoh T. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. Cytotechnology 1999, 31: 121-129.

Yang NS, Lu KH, Gordon I, Polge C. Vitrification of bovine blastocysts produced in-vitro. Theriogenology 1992, 37: 326 abstr.

Yotsushima K, Sakaguchi M, Shimizu M, Okimura T, Izaike Y. Effects of fatty acid-free bovine serum albumin and fetal calf serum supplementing repair cultures on pre- and post-warm viability of biopsied bovine embryos produced in vitro. Journal of Reproduction and Development 2004, 50: 471-476.

Younis AI, Brackett BG, Fayrer-Hosken RA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. Gamete Research 1989, 23: 189-201.

Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solution. Journal of Reproduction and Fertility 1993, 98: 139-145.

Zuelke KA, Brackett BG. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. Biology of Reproduction 1990, 43: 784-787.

APÉNDICE

PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Todas las soluciones utilizadas en los protocolos de criopreservación se realizaron en una solución base consistente en DPBS combinado con 10% de SFB y 1% de AA.

PROTOCOLOS DE CONGELAMIENTO LENTO

Congelamiento con glicerol – Incorporación en 1 paso (Gli-1P)

Incorporación del crioprotector:

☼ Sumergir el embrión en una solución de glicerol 10% y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente. Luego cargar el embrión en las pajuelas.

Curva de congelamiento:

☼ Colocar la pajuela en la congeladora a una temperatura inicial de -6ºC. Mantener la pajuela a esa temperatura durante 5 min, y luego inducir la nucleación ("seeding") por contacto con una pinza previamente sumergida en LN_2.

☼ Luego de 5 min de realizado el "seeding", comenzar la curva de enfriamiento, llevando la temperatura desde -6°C hasta -32°C a una tasa de descenso de -0,5°C/min.

☼ Mantener a esa temperatura durante 2 min.

☼ Sumergir la pajuela en LN_2.

Remoción del crioprotector:

☼ Descongelar la pajuela exponiéndola al aire durante 10 s y luego sumergirla en un baño de agua a 22ºC durante 20 s.

☼ Descargar el embrión en una cápsula de Petri.

☼ Sumergir el embrión en una solución de glicerol 6% y sacarosa 0,3 M durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de glicerol 3% y sacarosa 0,3 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión en una solución de sacarosa 0,3 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Lavar el embrión en solución base y transferirlo o colocarlo en cultivo.

Congelamiento con glicerol – Incorporación en 2 pasos (Gli-2P)

Incorporación del crioprotector:

☼ Sumergir el embrión en una solución de glicerol 5% y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de glicerol 10% y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente. Luego cargar el embrión en las pajuelas.

Realizar la curva de congelamiento y la remoción del crioprotector de la misma forma que en el protocolo Gli-1P.

Congelamiento con etilenglicol – Incorporación en 1 paso y transferencia directa (Eg-TrDir)

Incorporación del crioprotector:

☼ Sumergir el embrión en una solución de etilenglicol 1,5 M, mantenerlo durante 20 min a temperatura ambiente y cargarlo en una pajuela.

Curva de congelamiento:

☼ Colocar la pajuela en la congeladora a una temperatura inicial de -6ºC. Mantener la pajuela a esa temperatura durante 1 min, y luego inducir la nucleación ("seeding") por contacto con una pinza previamente sumergida en LN_2.

☼ Luego de 5 min de realizado el "seeding", comenzar la curva de enfriamiento, llevando la temperatura desde -6°C hasta -35°C a una tasa de descenso de -0,5°C/min.

☼ Mantener a esa temperatura durante 2 min.

☼ Sumergir la pajuela en LN_2.

Remoción del crioprotector:

☼ Descongelar la pajuela exponiéndola al aire durante 10 seg y luego sumergirla en un baño de agua a 35ºC durante 20 seg.

☼ Transferir el embrión a la receptora desde la misma pajuela.

Congelamiento con propilenglicol – Incorporación en 1 paso y transferencia directa (Pg-TrDir)

El método es igual al del protocolo Eg-TrDir, con la excepción del reemplazo del etilenglicol por propilenglicol en iguales concentraciones, y en que el tiempo de incorporación del crioprotector fue de 5 min.

La curva de congelamiento y la remoción del crioprotector se realiza de la misma forma que en el protocolo Eg-TrDir.

Congelamiento con glicerol – Incorporación en 3 pasos (Gli-3P)

Incorporación del crioprotector:

☼ Sumergir el embrión en una solución de glicerol 0,5 M y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de glicerol 1,0 M y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de glicerol 1,4 M y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente. Luego cargar el embrión en la pajuela.

Curva de congelamiento:

☼ Colocar la pajuela en la congeladora a una temperatura inicial de 20ºC. Mantener la pajuela a esa temperatura durante 1 min.

☼ Comenzar la curva de enfriamiento, llevando la temperatura desde 20°C hasta -6°C a una tasa de descenso de -1°C/min.

☼ Mantener a esa temperatura durante 5 min, y luego inducir la nucleación ("seeding") por contacto con una pinza previamente sumergida en LN_2.

☼ Luego de 5 min del "seeding", continuar el enfriamiento de -6°C hasta -30°C a una tasa de descenso de -0,3°C/min.

☼ Continuar el enfriamiento de -30°C hasta -33°C a una tasa de descenso de -0,1°C/min.

☼ Mantener a esa temperatura durante 2 min.

☼ Sumergir la pajuela en LN_2.

Remoción del crioprotector:

☼ Descongelar la pajuela exponiéndola al aire durante 10 s y luego sumergirla en un baño de agua a 27ºC durante 20 s.

☼ Descargar el embrión en una cápsula de Petri.

☼ Sumergir el embrión en una solución de glicerol 1,0 M y sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de glicerol 0,5 M y sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de glicerol 0,5 M y sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Lavar el embrión en solución base y transferirlo o colocarlo en cultivo.

Congelamiento con etilenglicol – Incorporación en 3 pasos (Eg-3P)

Incorporación del crioprotector:

☼ Sumergir el embrión en una solución de etilenglicol 0,5 M y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de etilenglicol 1,0 M y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de etilenglicol 1,5 M y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente. Luego cargar el embrión en la pajuela.

Curva de congelamiento:

☼ Colocar la pajuela en la congeladora a una temperatura inicial de 20ºC. Mantener la pajuela a esa temperatura durante 1 min.

☼ Comenzar la curva de enfriamiento, llevando la temperatura desde 20°C hasta -7°C a una tasa de descenso de -1°C/min.

☼ Mantener a esa temperatura durante 5 min, y luego inducir la nucleación ("seeding") por contacto con una pinza previamente sumergida en LN_2.

☼ Luego de 5 min del "seeding", continuar el enfriamiento de -7°C hasta -35°C a una tasa de descenso de -0,3°C/min.

☼ Continuar el enfriamiento de -35°C hasta -38°C a una tasa de descenso de -0,1°C/min.

☼ Mantener a esa temperatura durante 2 min.

☼ Sumergir la pajuela en LN_2.

Remoción del crioprotector:

☼ Descongelar la pajuela exponiéndola al aire durante 10 s y luego sumergirla en un baño de agua a 27ºC durante 20 s.

☼ Descargar el embrión en una cápsula de Petri.

☼ Sumergir el embrión en una solución de etilenglicol 1,0 M y sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de etilenglicol 0,5 M y sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Lavar el embrión en solución base y transferirlo o colocarlo en cultivo.

Congelamiento con etilenglicol – Incorporación en 3 pasos modificado (Eg-3P m)

La incorporación del crioprotector y la curva de congelamiento se realiza de la misma forma que en el protocolo Eg-3P.

Remoción del crioprotector:

☼ Descongelar la pajuela exponiéndola al aire durante 10 s y luego sumergirla en un baño de agua a 27ºC durante 20 s.

☼ Descargar el embrión en una cápsula de Petri.

☼ Sumergir el embrión en una solución de sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente.

☼ Lavar el embrión en solución base y transferirlo o colocarlo en cultivo.

PROTOCOLOS DE VITRIFICACIÓN

Vitrificación con propilenglicol + glicerol (Pg+Gli)

Vitrificación:

☼ Sumergir el embrión en una solución de glicerol 10% y propilenglicol 20% y mantenerlo durante 10 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de vitrificación consistente en glicerol 25% y propilenglicol 25%, y mantenerlo un máximo de 30 s a 4-12ºC.

☼ Cargar el embrión en la pajuela y sumergirla en nitrógeno líquido.

Remoción del crioprotector:

☼ Sumergir la pajuela en un baño de agua a 20ºC.

☼ Descargar el contenido de la pajuela en una solución resultante de la mezcla de volúmenes iguales de la solución de vitrificación y una solución de sacarosa 1,0 M. Mantener el embrión en esa solución durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de sacarosa 1,0 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Lavar el embrión en solución base para su transferencia o cultivo.

Vitrificación con etilenglicol + Ficoll 70 + sacarosa (EFS)

Vitrificación:

☼ Sumergir el embrión en una solución de etilenglicol 20% y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de vitrificación consistente en etilenglicol 40%, Ficoll 70 18% y sacarosa 0,3 M, y mantenerlo durante 30 s a temperatura ambiente.

☼ Cargar el embrión en la pajuela y sumergirla en nitrógeno líquido.

Remoción del crioprotector:

☼ Sumergir la pajuela en un baño de agua a 25ºC.

☼ Descargar el embrión en una cápsula de Petri.

☼ Transferir el embrión a una solución de sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Lavar el embrión en solución base para su transferencia o cultivo.

Vitrificación con la solución EFS modificada (EFSm)

Se realizó una modificación del protocolo EFS, la cual consistió en equilibrar el embrión en 2 pasos, antes de ser vitrificado: primero en una solución de etilenglicol 10% y luego en una solución de etilenglicol 20%, durante 5 min a temperatura ambiente en cada paso. La remoción del crioprotector se realizó de la misma forma que en el protocolo EFS.

Vitrificación con etilenglicol + glicerol (Eg+Gli)

Vitrificación:

☼ Sumergir el embrión en una solución de glicerol 10% y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de glicerol 10% y etilenglicol 20% y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de vitrificación consistente en glicerol 25% y etilenglicol 25%, y mantenerlo durante 30 s a temperatura ambiente.

☼ Cargar el embrión en la pajuela y sumergirla en nitrógeno líquido.

Remoción del crioprotector:

☼ Sumergir la pajuela en un baño de agua a 37ºC.

☼ Descargar el contenido de la pajuela en una solución resultante de la mezcla de volúmenes iguales de la solución de vitrificación y una solución de sacarosa 1,0 M. Mantener el embrión en esa solución durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de sacarosa 0,5 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Transferir el embrión a una solución de sacarosa 0,25 M y mantenerlo durante 5 min a temperatura ambiente.

☼ Lavar el embrión en solución base para su transferencia o cultivo.