



## RESUMEN

### CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS

Con el fin de describir los diferentes métodos de criopreservación de embriones bovinos, haremos una recopilación de información de varios autores, con lo que tendremos un documento de discusión acerca del método más adecuado y adaptable para nuestra realidad.

Los principales métodos utilizados para la crioconsevación de embriones bovinos son, el de congelación convencional y el de vitrificación, con sus respectivos protocolos y variantes. Los dos tiene el mismo fin que es conservar el embrión el mayor tiempo y con la mayor fertilidad, pero después de el análisis de dichos métodos se puede concluir que a pesar de los cambios que se producen a nivel estructural y metabólico en el post congelado en ambos métodos, el de congelación convencional es el mas adecuado debido a que se garantiza una acción mas eficiente de los crioprotectores gracias a la congelación lenta, lo que no sucede con la vitrificación por la violenta congelación del embrión al entrar en contacto con el nitrógeno liquido produciendo daños celulares.

**PALABRAS CLAVES:** conservación, vitrificación, embriones, congelación, reproducción, crioprotectores.



## INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	11
II. REVISION DE LITERATURA	11
2.1    Concepto de Crioconservación	11
2.2    Crioconservación de embriones bovinos	12
2.2.1    Objetivos de la Crioconservación	12
2.2.2    Importancia (Económicas-Zootécnicas), ventajas y desventajas de embriones	13
2.2.2.1    Importancia Económica	13
2.2.2.2    Importancia Zootécnica	13
2.2.2.3    Ventajas Operativas de embriones Congelados	14
2.2.2.4    Ventajas Económicas de embriones Congelados	14
2.2.2.5    Desventajas de embriones congelados	15
2.3    Tipos de criopreservación de embriones Congelados	15
2.3.1    Congelación Convencional	16
2.3.2    Vitrificación	17





2.3.4 Congelación Ultrarrápida	18
2.3.5 Refrigeración	19
2.3.5 Crioprotectores	20
2.4 Protocolos y Curvas	21
2.4.1 Congelación Convencional Embriones	21
2.4.1.1 Exposición de los embriones a las Soluciones de congelación	22
2.4.1.2 Envasado de los embriones	23
2.4.1.3 Enfriamiento inicial	24
2.4.1.4 Inducción de la cristalización o "seeding	24
2.4.1.5 Descenso térmico lento y controlado	24
2.4.1.6 Descenso térmico rápido	25
2.4.1.7 Almacenamiento en N <sub>2</sub> líquido	25
2.4.2 Descongelación	26
2.4.3 Extracción de los crioprotectores	26
2.4.3.1 Métodos de extracción de crioprotectores	27
2.4.3.1.1 Método Estándar	27
2.4.3.1.2 Método One-step	27
2.4.3.1.2 Método de transferencia directa	30
2.4.2 Protocolo de vitrificación de embriones	31
2.4.2.1 Exposición de los embriones a las	32





	Soluciones de vitrificación	
2.4.2.2	Envasado de los embriones en Recipientes Apropiados y en pequeños volúmenes	33
2.4.2.3	Descenso ultrarrápido de la temperatura (vitrificación).	33
2.4.2.4	Calentamiento rápido de los embriones Hasta temperaturas fisiológicas	34
2.4.2.5	Extracción de los crioprotectores	34
2.5	Sobrevida embrionaria poscriopreservación evaluada in vitro	36
2.6	Efecto del descenso térmico sobre las Estructuras celulares	36
2.6.1	Crioinjurias	36
2.6.1.1	Formación de hielo intra o extracelular	37
2.6.1.2	Aumento o disminución excesiva del volumen celular por efecto osmótico	38
2.6.1.3	Efecto toxicógeno del crioprotector	38
2.6.1.4	Alteraciones de la membrana celular	49
2.6.1.5	Fractura embrionaria o de la zona pelúcida	40
2.6.1.6	Otras crioinjurias	40
2.6.2	Respuesta celular ante las criainjurias	42



2.6.2.1	Cambios estructurales y ultraestructurales relacionados con la criopreservación	42
2.6.2.2	Cambios metabólicos asociados a la Criopreservación	43
III. CONCLUSIONES		44
IV. BIBLIOGRAFIA		45
V. ANEXOS		49
<b>INDICE FIGURAS</b>		
<b>Figura.1</b>	Esquema de los procesos de criopreservación de las soluciones acuosas	49
<b>Figura.2</b>	Partes de termo de nitrógeno	61
<b>Figura.3</b>	Refrigeradora donde se ubican los embriones para congelación	61
<b>Figura.4</b>	Micromanipulador para embriones	62
<b>Figura.5</b>	Pipetas	62
<b>Figura.6</b>	Microscopio invertido luz ultravioleta	62
<b>Figura.7</b>	Platina térmica	63
<b>Figura.8</b>	Arranque	63
<b>Figura.9</b>	Congelación Inicial	64
<b>Figura.10</b>	Equipo para crioconservación	64
<b>Figura.11</b>	Inicio de la congelación	65





## INDICE CUADROS

<b>Cuadro.1</b> Primeros nacimientos informados a partir de embriones criopreservados.	50
<b>Cuadro.2</b> Protocolo general de congelación embriones	50
<b>Cuadro.3</b> Tasa de gestación con distintas metodologías de vitrificación.	51
<b>Cuadro.4</b> Calentamiento de embriones en la vitrificación	51
<b>Cuadro.5</b> Vitrificación de embriones	52
<b>Cuadro.6</b> Curva de enfriamiento de congelación convencional y vitrificación	52
<b>Cuadro.7</b> Envasado de los embriones para congelación	52
<b>Cuadro.8</b> Extracción de los crioprotectores	53
<b>Cuadro.9</b> Tasa de gestación con distintas metodologías de congelación.	53
<b>Cuadro.10</b> Metodos estándar desarrollado por Wilmot y Rowson (1973)	55

## INDICE TABLAS

### Tabla.1

Sobrevida (protrusión fuera de la zona pelúcida) de Blastocistos/Blastocistos expandidos	56
--	----



producidos in vitro u obtenidos in vivo, congelados-descongelados, evaluada mediante cultivo in vitro, informada por diversos autores.

- Tabla.2** Sobrevida (reexpansión del blastocele y protrusión fuera de la zona pelúcida) de Blastocitos y Blastocitos expandidos bovinos producidos in vitro u obtenidos in vivo, vitrificados-calentados evaluada mediante cultivo in vitro, según diversos autores. 58
- Tabla.3** Resultados obtenidos con la transferencia no quirúrgica de embriones refrigerados. 54
- Tabla.4** Eficacia de los métodos de crioconservación de embriones bovinos producidos in vitro. 59



## UNIVERSIDAD DE CUENCA



## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

### CURSO DE GRADUACION “BUIATRIA”

**TITULO:**

**“CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS”**

Monografía de grado previa a la

Obtención del título de  
Medicina  
veterinaria y zootecnia

**TUTOR:** Dr. MVZ Gonzalo López

**AUTOR:** JOSE TEODORO OCHOA OCHOA

**CUENCA – ECUADOR**

**2010-2011**



## I. INTRODUCCIÓN

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

La producción de embriones bovinos producto de fecundación in vitro y superovulación de vacas de alto merito, son una herramienta que ofrece nuevas perspectivas para la aceleración del progreso genético. Para la obtención de embriones se requiere de protocolos de superovulación, de lavados y de equipos especiales para la succión de ovocitos, en la fertilización in vitro.

La utilización de las bajas temperaturas para conservar los embriones producidos por estas tecnologías se ha convertido en una herramienta indispensable que permitirá consolidar y aumentar el impacto de estas tecnologías. La criopreservación y el almacenamiento de embriones a bajas temperaturas presentan numerosas ventajas, tanto desde el punto de vista biológico como desde el comercial:

- Permite una reducción de costes derivados de la aplicación de las técnicas reproductivas.
- Facilita una disociación de todas estas técnicas de la actividad reproductiva cíclica que presentan las especies mamíferas de interés, consiguiéndose una

independencia temporal del estado fisiológico de los animales (hembras receptoras, por ejemplo).

- Limita la deriva genética
- Elimina las patologías que normalmente se asocian al mantenimiento de animales vivos.
- Posibilita la conservación de razas o especies en riesgo de extinción mediante la creación de bancos de embriones congelados, manteniendo intacto el patrimonio genético.

La criopreservación está influida por un elevado número de variables. A pesar de esto, y con independencia del sistema utilizado, los principios básicos persiguen una protección de las células frente a los principales efectos perjudiciales del proceso, a saber, formación de hielo intracelular, deshidratación y efecto tóxicos de los crioprotectores.

La congelación de embriones para su conservación y posterior utilización es una técnica esencial que tiene como objetivo almacenar los embriones por largos períodos de tiempo que nos permitan su posterior utilización, esta técnica nos ayuda a reducir substancialmente las dificultades logísticas de combinar la cantidad de vacas o novillas receptoras disponibles, aprovechamiento de los embriones que nos sobran de una colecta, optimización de las receptoras, simplificación de movimiento del material genético, preservación de estoques genéticos escasos o superiores y también la criopreservación promueve una



mayor adaptación del producto al medio y mayor seguridad zoosanitaria. Actualmente existen metodologías establecidas para la congelación de os embriones y que permite la aplicación comercial de la criopreservación en larga escala para embriones bovinos producidos in vivo, resultando tasas de gestación que varían entre 35 y el 50%, o sea ligeramente inferior a aquellas obtenidas con embriones en fresco.

La congelación lenta con etilenglicol usado como crioprotector ha sido el método mas utilizado para la congelación de embriones bovinos producidos en vivo.

## **I. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

- Describir la metodología y los parámetros técnicos involucrados en la criopreservación de embriones en bovinos

### **ESPECIFICOS**

- Identificar los cambios mas importantes en el proceso de la criopreservación de embriones.
- Generar información para alumnos, profesionales veterinarios y ganaderos.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 CONCEPTO DE CRIOCONSERVACIÓN**

La **crioconservación** es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas



temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de *vida suspendida* por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenida.

## 2.2 CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONES BOVINOS

Según Hincapie, J.J.; Brito, R.; Campo, E. 2005. Si el tiempo que transcurre desde la recolección y la transferencia del embrión, se logra reducir 1 o 2 horas optimizamos las condiciones de rutina. no es necesario medios de conservación, pero para intervalos mayores 6 a 12 horas se requiere usar medios de cultivo.

Sobre las 24 a 36 horas se conservan de 0 a 4°C con porcentajes normales de gestación (2)

### 2.2.1 Objetivos de la Crioconservación

El objetivo principal de la crioconservación es la interrupción del metabolismo por un tiempo determinado arbitrariamente durante el que los embriones se encuentran en una anabiosis (estado de vida latente) artificial. (Gorlach, A, 1998).; dice que, los momentos mas críticos y sensibles de la crioconservación es en el momento de la congelación y descongelación, en es instantes suceden una infinidad de procesos físico-químicos regidos por las diferencias de temperatura y transporte de agua entre las células y el medio. Sin embargo para mantener sus



características originales (metabolismo y capacidad de crecimiento) se obtiene únicamente con un crioprotector y de diferentes protocolos de congelación. (1)

## **2.2.2 Importancias (Económicas - Zootécnicas), Ventajas y Desventajas de Embriones Congelados**

### **2.2.2.1 Importancia económica**

Justifican todos los esfuerzos que se hagan en el mantenimiento de los recursos genéticos de animales domésticos. En primer lugar, porque contribuyen al mantenimiento de muchos ecosistemas (aunque también pueden contribuir a la destrucción de otros si no se gestiona correctamente. El transporte internacional de un animal vivo puede costar entre \$ 1000 o mas, mientras que por el mismo precio o menos es posible transportar un contenedor lleno de embriones congelados (500 – 4000) la congelación de embriones le da así a la transferencia de embriones el segundo valor de mayor importancia en su aplicación comercial.

### **2.2.2.2 Importancias Zootécnicas**

La ganadería es fundamental para la seguridad alimentaria y de los medios de vida tradicionales, especialmente en el mundo en desarrollo. El ganado proporciona carne, leche, huevos, fibras, pieles, estiércol utilizado como fertilizante y combustible, además de fuerza de arrastre para el cultivo y el transporte, y una considerable variedad de otros productos y servicios. Para gran parte de la población rural del mundo la cría del ganado es un componente importante de su forma de vida.



### 2.2.2.3 Ventajas operativas de embriones congelados

**Tiene grandes ventajas sobre los frescos:**

- La congelación del sobrante de embriones sobre receptoras disponibles, aprovechando todo el material genético.
- Transferencia simultanea de embriones de diferentes combinaciones de padres. Esto es importante para las exposiciones y para las pruebas de comportamiento.
- Los nacimientos pueden programarse de acuerdo al manejo de la explotación.
- Reducción del lote de receptoras: los embriones congelados esperan en nitrógeno liquido la sincronización de celos de las receptoras y el momento óptimo para la transferencia

### 2.2.2.4 Ventajas comerciales de embriones congelados

- Los embriones congelados, procesados de acuerdo a las normas sanitarias sugeridas por la iets., no transmiten enfermedades, por lo tanto desaparecen las barreras sanitarias haciendo posible el comercio internacional de embriones.
- Los embriones pueden ser descongelados y transferidos en cualquier época del año y region, en receptoras adaptadas a los factores climáticos del lugar.



- El problema de adaptación a elevadas temperaturas, altitud, ectoparásitos (garrapatas y moscas) alimentación y plantas toxicas, etc. Depende del biotipo adulto seleccionado, para cada ambiente y sistema de explotación.

#### **2.2.2.5 Desventajas de embriones congelados**

- El índice de gestación obtenido con embriones congelados es 10% inferior al de embriones frescos.
- La otra desventaja es financiera, debemos esperar como mínimo dos años para que los animales nacidos de embriones comiencen a producir. No obstante, esta desventaja se neutraliza cuando obtenemos crías realmente superiores, ya que los propietarios originales normalmente no se desprenden de esos animales, menos aun al precio que se pagan los embriones.

### **2.3 TIPOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS**

En la **congelación convencional**, ampliamente difundida, los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura lo mantienen durante el enfriamiento. (Figura. 10) Este, se lleva a cabo lentamente permitiéndole a los embriones contraerse y ceder agua, en respuesta al incremento gradual de la concentración de la solución extracelular. Se han desarrollado otras técnicas en las que se efectúa una deshidratación parcial de los embriones sin que estas



alcancen su equilibrio osmótico, ellas son la **vitrificación** y la **congelación ultrarrápida**. (Figura 1) En la primera, cuya dicha deshidratación ocurre antes del enfriamiento rápido y en la segunda, durante un breve periodo intermedio de exposición de los embriones a temperatura debajo de 0°C. (Tabla. 4) (5,15)

### 2.3.1 CONGELACIÓN CONVENCIONAL

Según Mucci, N, et al, 2005. El proceso de congelación podría resumirse mencionando que a medida que una solución acuosa se enfria por debajo de 0º C disminuye el movimiento molecular, sobreenfriándose hasta alcanzar una masa crítica de núcleos, momento en el cual se libera el calor latente de cambio de estado. (Figura. 11) Uno de los efectos de la cristalización en las soluciones acuosas es remover agua de la solución, ya que los cristales que se forman están compuestos por agua pura, por lo cual la solución remanente, que permanece sobreenfriada, se concentra. De este modo, esta nueva solución permanece líquida hasta que se alcanza, mediante una mayor extracción de calor, el nuevo punto de equilibrio de congelamiento. Este proceso se repite hasta que a una determinada temperatura, denominada eutéctica o “punto eutéctico”, la fase líquida remanente y los solutos solidifican. Mientras que (Serrano, C. MV; Sierra, R. Bact; Sanchez, J. MVZ; Restrepo, L. Esp.; Olivera, M. MV.,Dr.Sci.Agr. en 2002). Dicen que la formación de cristales de hielo es mayor, Baja concentración de crioprotectores: probabilidad de daño por enfriamiento. Alto costo: equipo para el descenso controlado de la temperatura (15,17)



Durante la fase inicial de preenfriamiento, (Díez, C.; en 2003) los embriones se exponen a la presencia del crioprotector en una fase que denominamos de equilibración. La respuesta inmediata del embrión ante la presencia de un CP (crioprotector) permeable es una rápida disminución de volumen por pérdida del agua intracelular, hasta que se alcanza el equilibrio. Este fenómeno se debe a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular y a que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores; la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del CP. A medida que el CP penetra en el embrión, éste se expande gradualmente a causa de una reentrada de agua para el mantenimiento del equilibrio osmótico. El momento en que se produce esta reexpansión refleja:

- La especie del embrión
- El estadio de desarrollo embrionario.
- El ratio superficie/volumen del embrión.
- El crioprotector utilizado.
- La temperatura de exposición.(10)

### 2.3.2 VITRIFICACIÓN

Proceso físico mediante el cual la solución de criopreservación, con alta concentración de crioprotectores penetrantes y no penetrantes, y el o los embriones en ella contenidos, alcanzan un estado altamente viscoso debido a un rápido enfriamiento, sin formar cristales de hielo. (Díaz, C.; Muñoz, M.; Caamaño, N.; Gómez, 2004.) Todo el



proceso desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido (NL) no requiere más de 10 minutos.

- No hay formación de cristales de hielo
- Alta concentración de crioprotector: mayor probabilidad de daño osmótico y por toxicidad .
- Bajo costo: enfriamiento directo en N2 líquido (13,11)

Según Mucci, N, et al, 2005. El embrión esta sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante la descongelación. Para obtener buenos resultados se deben tomar en cuenta los siguientes factores: (Cuadro. 3)

- volumen de la muestra,
- concentración de crioprotector,
- método de adición
- temperatura
- tiempo de equilibrio
- solidificación
- tasa de enfriamiento
- cambios en el volumen (15,10)

### 2.3.3 CONGELACIÓN ULTRARRAPIDA

Según Mucci, N, et al 2005. Menciona que. Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, Luego se les deshidrata nuevamente. Se utiliza una solución con 2 a 4,5 Molar de un crioprotector permeable (glicerol, propanediol, DMSO o etilenglicol), y 0,25 a 0,5 Molar de otro no permeable (sacarosa, tetralosa, lactosa). (Palma, G.A.; Brem, G en 1993.) Esta segunda deshidratación deja a los



embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el cuello del termo de nitrógeno, durante 5 minutos, Posteriormente son sumergidas al nitrógeno líquido (NL). Los resultados obtenidos fueron dispares, según el estadio de desarrollo del embrión congelado.

Otros autores como Díaz, C, et al, 2004.; destaca que. La desvitrificación requiere diluir y retirar el agente crioprotector antes de transferir el embrión. Las condiciones de manipulación (temperatura ambiental - 39°C, temperatura de las soluciones de desvitrificación - 41°C-, dilución en soluciones con concentraciones decrecientes de sacarosa) son difíciles de establecer en las granjas, extremo muy importante en el caso del ganado vacuno. (15,5,11)

### 2.3.4 REFRIGERACIÓN

Algunos autores como Golanch, A 1998. y Palma, G en 2008 coinciden. En los últimos años con la transferencia no quirúrgica de embriones refrigerados, se obtienen porcentajes de 44 a 50%.

Los embriones en largo tiempo y a temperatura ambiente decrecen su capacidad de desarrollo. Por medio de la refrigeración a temperaturas de 0 a 4 °C por no más de 24 horas. Se puede mantener a los embriones en PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador. Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura. La refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la congelación. (Tabla.3)



No obstante, a pesar de los buenos resultados y de su sencillez, en la actualidad ha caído prácticamente en desuso debido a que la congelación convencional se ha convertido en una técnica que si bien es más costosa, permite mantener la viabilidad embrionaria por tiempos ilimitados, con las ventajas prácticas que ello trae aparejado. (1,4)

### **2.3.5 CRIOPROTECTORES**

Según De la Fuente, J. 2009; habla sobre los crioprotectores en la actualidad

Grupos de crioprotectores:

1.- De bajo peso molecular y permeables, como:  
Etilenglicol, 1-2 Propanodi ol, Glicerol y otros.

- Reemplazan el agua intracelular minimizando la formación de cristales.
- Regulan la deshidratación y protegen la estructura proteica.

2.- De bajo peso molecular y no permeables , como:  
Glucosa, Sacarosa y otros azúcares.

- Deshidratan las células antes de la congelación minimizando la formación de cristales.
- Estabilizan la estructura de la membrana.

3.- De alto Peso molecular no permeables, como:  
Polivinilpirrolidona, Polivinil alcohol y otros polímeros como el Ficol.



- Protegen en congelación/descongelación alterando el tamaño y la forma de los cristales. (8)

Mientras que Colazo, M.G.; Mapletoft, R.J.; en 2007 dice que. Los crioprotectores mas permeables como el glicerol permiten la llamada “transferencia directa” se transfiere el embrión sin tener que remover el crioprotector, el embrión es descongelado y depositado en el útero. Con una tasa de preñez de 58%. (7)

## 2.4 PROTOCOLOS Y CURVA

### 2.4.1 CONGELACION CONVENCIONAL DE EMBRIONES.

Según Neira, J. 2008. Los pasos generales durante el proceso de congelación-descongelación de embriones pueden resumirse de la siguiente manera:

1. Colocar el embrión en medio de congelación (PBS + 0.4% de BSA + 10% de Ethilene glycole (1.5 Molar) a temperatura de laboratorio y esperar de 10 a 15 minutos.
2. Realizar el montaje del embrión en la pajilla de empaque e identificarlo.
3. Enfriar la pajilla hasta -6°C a una rapidez de 5°C por minuto.
4. Inducir la cristalización y esperar de 5 a 10 minutos; la inducción de la cristalización se realiza, con una pinza metálica que sujete un copo de algodón, el cual se deposita previamente en nitrógeno líquido por 30 segundos y después se toca la porción de la pajilla en



donde se encuentra el embrión, logrando así acelerar el paso de líquido a sólido.

5. Enfriar a velocidad de 0.3 a 0.6°C por minuto hasta -30 ó 35°C.

6. Colocar la pajilla en nitrógeno líquido y almacenar. (3)

#### **2.4.1.1 Exposición de los embriones a las soluciones de congelación.**

Autores como, Mucci, N, et al, 2005. Dice que. Los embriones son congelados generalmente en una solución salina tamponada fosfato (PBS) suplementada con proteínas o macromoléculas (suero bovino, albúmina bovina (BSA)), a la cual se le adiciona sustancias denominadas crioprotectoras, que modifican el comportamiento físico de la solución y protejen a las células de los daños asociados al descenso térmico.

Figura. 9 Estas sustancias pueden penetrar o no la membrana plasmática de las células embrionarias (crioprotectores penetrantes y no penetrantes, respectivamente), y en esta metodología se utilizan en concentraciones que no superan 2 Molar. Los agentes penetrantes pueden reemplazar el agua intracelular antes del enfriamiento, lo cual en combinación con una tasa de descenso térmico lenta y controlada, reducirían los cambios de volumen celular y minimizarían la cristalización intracelular. Los crioprotectores no penetrantes ejercen su acción a través de un aumento en la osmolaridad de las soluciones de criopreservación, promoviendo la deshidratación celular y disminuyendo entonces la formación y el tamaño de los cristales de



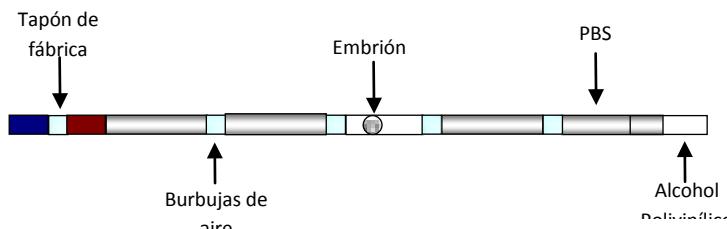


hielo. (Palma, G.A 2008) En los últimos años, se ha intentado eliminar las macromoléculas de origen animal de las soluciones de criopreservación, reemplazándolas por alcohol polivinílico o hialuronato de sodio, con el fin de prevenir problemas sanitarios y favorecer el comercio de embriones así conservados. Sin embargo, los resultados no han sido muy alentadores por lo cual es necesario seguir investigando el impacto de estos elementos sobre la sobrevida poscriopreservación. (15)

#### **2.4.1.2 Envasado de los embriones.**

Según Palma, G.A.; Brem, G 1993. Dice que en la actualmente el elemento más utilizado para contener los embriones, tanto para la criopreservación como para su transporte y/o transferencia a una hembra receptora, lo constituye la pajuela de plástico de 0,25 ml de capacidad. (Mucci, N, et al, 2005). Existen diversos modos de cargar las pajuelas, pero en la mayoría, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0,5 a 2 centímetros de solución de congelación separado de otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa como en el método One-Step (Leibo, 1984) (descripto más adelante), separadas por burbujas de aire. (Cuadro. 8).

En general, las pajuelas una vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico. (Figura1). (15,5)



FUENTE (Dr. MVZ PhD Gustavo A. Palma)

#### 2.4.1.3 Enfriamiento inicial.

Se efectúa mediante la introducción de los embriones envasados en la criocámara de una máquina congeladora programable. Figura. 8 (Mucci, N, et al 2005). Así, la muestra se enfría desde la temperatura de equilibrio hasta alrededor de -7 °C. Cuadro. 6 (15)

#### 2.4.1.4 Inducción de la cristalización o “seeding”.

Según Mucci, N, et al 2005. Comentan que se debe efectuar luego de 5-7 minutos de introducidas las pajuelas en la criocámara, tocando el extremo de las pajuelas con un elemento metálico enfriado en N<sub>2</sub> líquido. (Palma, G.A.; Brem, G 1993), Con este procedimiento se evita un sobreenfriamiento excesivo de la solución y por lo tanto, se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación del calor latente de cambio de estado. (15)

#### 2.4.1.5 Descenso térmico lento y controlado.

El descenso térmico se efectúa utilizando máquinas congeladoras programables, desde la temperatura en la cual se induce el “seeding” hasta -30 a -40 °C según lo descripto por (Palma, G.A.; Brem, G 1993), y a tasas comprendidas entre -0,3 y -0,5 °C/minuto. De este modo



se logra una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización intracelular. Mucci, N, et al 2005. (15,5)

#### **2.4.1.6 Descenso térmico rápido.**

Alcanzada la temperatura de -30 a -40 °C las pajuelas se introducen directamente en N<sub>2</sub> líquido. De este modo se alcanza, junto con el descenso térmico lento, una formación controlada de cristales de hielo en la solución de congelación, determinando finalmente la vitrificación del embrión y del medio que inmediatamente lo rodea (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993). (15)

#### **2.4.1.7 Almacenamiento en N<sub>2</sub> líquido.**

Según lo descrito por José C. Segura-Correa, Rubén C. Montes-Pérez.; 2001. Se efectúa en contenedores (termos) de N<sub>2</sub> líquido a -196 °C. no se producen daños en intervalos de tiempo abarcables (20 años), pero si se producen daños a través de radiaciones extrañas, en tiempos mas prolongados (milenios). Sin embargo el almacenamiento indefinido sin peligro de sufrir daño siempre y cuando haya nitrógeno en el tanque.

Cuando se evapora el nitrógeno, el frio de vaporización que actua como regulador de la estabilidad de la temperatura faltaría y los embriones se mueren. (Mucci, N, et al, 2005.; Gorlach, A, 1998.) El almacenamiento de embriones permitiría que una línea o raza se reconstituyera en una sola generación, mientras que el almacenamiento de semen necesitaría de varias generaciones de retrocruzas. (Figura 2) (12,15,1)



## 2.4.2 DESCONGELACIÓN.

Se han desarrollado protocolos estándares de descongelación, de uso ya común para cada uno de los diferentes métodos de criopreservación. De esta manera se extraen las pajuelas con los embriones congelados del nitrógeno líquido, se mantienen 15 segundos en el aire y a continuación otros 15 segundos en agua caliente a 30 °C donde descongelan. Después de esto se secan las pajuelas, se quita el bastón o tapón rotulado y, según la técnica de congelación seguida, se someten a una manipulación previa (dilución de la glicerina) o, si son embriones conservados en etilenglicol, se transfieren directamente. (15,1,18)

## 2.4.3 EXTRACCIÓN DE LOS CRIOPROTECTORES

Luego de la congelación-descongelación, la mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones antes de ser transferidos a hembras receptoras o colocados en cultivo. (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993), (Cuadro. 9) Esto debe efectuarse porque si al momento de la descongelación, las células cargadas de crioprotectores son expuestas, por ejemplo, a una solución de PBS isosmolar respecto de las células en condiciones normales o al tracto reproductor femenino, debido a que el agua difunde más rápido que estos compuestos a través de la membrana plasmática, las células se desintegrarían por el shock osmótico. Por este motivo, se recurre a la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crioprotector utilizado. (Cuadro. 8) Otra alternativa es



emplear sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante. (15,5)

### **2.4.3.1 Métodos para extracción de crioprotectores**

#### **2.4.3.1.1 Método Estándar**

Según Gorlach, A 1998. La congelación de embriones de bovinos utilizando glicerol como crioprotector es el método más difundido actualmente “método estándar”. Este método garantiza los resultados de las transferencias bastante estables.

La crioprotección, preparación y criopreservación de los embriones se describen a continuación: los embriones se mantienen con crioprotectores (medio de glicerol) a temperatura ambiente durante 10m a 15 minutos y se aspiran en las pajuelas. (Palma, G.A 2008) Las pajuelas se sellan con un tapón rotulado (stick).

El congelado se realiza a temperaturas + 6°C. El descongelado se realiza de la siguiente manera (15 segundos en el aire, 15 segundos en agua caliente a 30°C) hasta que seque la pajuela, el extremo abierto de la pajuela se coloca perpendicular y algo inclinado sobre la placa de petri y se corta el tapón de algodón, saliendo el embrión en el medio del crioprotector en la placa de petri. (Cuadro. 10)

#### **2.4.3.1.2 Método one-step.**



El método "one step" representa una gran ventaja práctica dado que posibilita transferir embriones congelados a campo de manera similar a lo que ocurre con la inseminación artificial. (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993), No obstante, cuando el glicerol es extraído dentro de la pajuella, la viabilidad embrionaria puede ser afectada si no se logra una mezcla homogénea de las distintas soluciones. (15,5)

Según D Luca, L. 2002. Se va a realizar de la siguiente manera:

1. Selección del embrión. Separar mórulas de blastocistos.
2. Lavar 10 veces con una solución de Dulbecco modificado, con 10% de suero fetal bovino.
3. Mórulas: sumergir durante 10 minutos el embrión en una solución de Dulbecco, con 1,5 molar de glicerol, más 0,1 molar de sucrosa. Blastocistos: sumergir durante 10 minutos el embrión en una solución de Dulbecco, con 1,5 molar de glicerol, más 0,2 molar de sucrosa.
4. Tomar una pajuella de 0,25cc y cargar en ella el embrión en el siguiente orden:
  - a) 1ra.columna de Dulbecco con suero fetal al 10%.
  - b) 2da.columna, pequeña burbuja de aire.
  - c) 3ra.columna de Dulbecco con medio de congelación.
  - d) 4ta.columna, pequeña burbuja de aire.
  - e) 5ta.columna, cargar el embrión en su medio.





- f) 6ta.columna, pequeña burbuja de aire.
- g) completar el resto de la pajuela con medio de congelación.
5. Llevar los embriones a la congeladora con una temperatura de entre -6°C a -7°C, donde permanecerán 10 minutos en stand by.
6. A su término tocar la pajuela a la altura de la 3ra. columna con una pinza hemostática, previamente sumergida en nitrógeno líquido para que alcance en su extremo los -196°C. Este método (Seeding) evitará la muerte del embrión por sobrefusión.
7. La corrida de temperatura será de 0,5°C por minuto hasta alcanzar los -35°C, momento en que se introducirá la pajuela en nitrógeno líquido (Plunging)
8. DESCONGELAMIENTO: Previa revisión de las receptoras para determinar si existe cuerpo lúteo apto, proceder en el siguiente orden:
- tomar la pajuela con una pinza y exponerla a temperatura ambiente durante 1 segundo.
  - sumergir la pajuela en agua a 35°C durante 1 minuto.
  - Sacar la pajuela del agua y secarla prolijamente, SIN AGITARLA.
  - cortar el extremo con un cutter especial evitando agitarla.



- e) cargar la pajuela en la pipeta de transferencia e implantar el embrión sobre el cuerno en que se presenta el cuerpo lúteo. (9)

#### **2.4.3.1.3 Método de transferencia directa**

Según. Palma, G.A.; Brem, G 1993. Describen que considerado los inconvenientes del método anterior descrito, surgió la necesidad de encontrar nuevas alternativas para la transferencia a campo. Actualmente, el método de transferencia directa permite descongelar el embrión y transferirlo prescindiendo de la extracción del criopreservante. Existen dos variantes de este método, en una, el embrión es expuesto a una solución de glicerol y sucrosa previo a la congelación. Ello provoca una deshidratación extrema del embrión con una reducción de su volumen de alrededor del 40% al final del periodo de estabilización, lo que evita el shock osmótico post-descongelación . en consecuencia, estos embriones la congelación lenta puede ser detenida antes (a -25 °C) dada que no hay riesgo de formación de cristales durante la congelación rápida. La sucrosa esta involucrada en el transporte activo de iones, mecanismo que es controlado por el sistema  $Na^*k^*$ ATPasa, el que inhibido por el glicerol. Por lo tanto, ese considera que la presencia de sucrosa en el medio de congelación permitiría a los embriones, restablecer el potencial de equilibrio químico durante la descongelación. Además, la sucrosa, al igual que otros carbohidratos, preserva la integridad estructural y funcional de las membranas. (Mucci, N, et al, 2005). Esto explicaría los resultados



beneficiosos obtenidos suplementando el medio de congelación con un 20% de rafinosa.

En la otra variante del método de transferencia directa, se reemplaza el glicerol por etilenglicol, crioprotector que tiene un menor peso molecular que el glicerol y por lo tanto, resulta más permeable con lo que provoca pequeños cambios de volumen celular. Al momento de envasar el embrión, se incluyen dos columnas de PBSS en la pajuela para facilitar la remoción del etilenglicol desde el embrión y disminuir la cantidad de crioprotectores transferida al útero de la receptora, permitiendo reducir efectos locales en el ambiente uterino. (15,5)

#### **2.4.2 PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES**

Según Martinez, A. 2006. Describe que todas las soluciones utilizadas en los protocolos criopreservación se realizaron en una solución base consistente en DPBS combinado con 10% de SFB y 1% de AA. En todos los tratamientos los embriones fueron cargados individualmente en pajuelas de 0,25 ml (IMV, L'Aigle, Francia). Una vez criopreservados los embriones fueron almacenados en nitrógeno líquido durante 6 a 12 meses hasta la transferencia. Según (Restrepo, G., M.Sc, Vasquez, N., M.Sc.; 2009). Dice que la desvitrificación se realiza de la siguiente manera. Pajilla fue retirada desde el nitrógeno líquido y expuesta al aire por 3 segundos, para luego sumergir su extremo más delgado en 1.2ml de un primer medio de devitrificación (D1) compuesto por TCM-199 Hepes con 20% de SFB y 0.25M de sucrosa. Los





oocitos fueron expelidos en el medio a 39°C durante 5 minutos. Despues fueron transferidos a una segunda solución de desvitrificación (D2) compuesta por TCM-199 Hepes con 0.15M de sucrosa, durante 5 minutos a 39°C, para luego ser expuestos a solución EQ durante 5 minutos a 39°C. (13,16)

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

- Descenso ultrarrápido de la temperatura.
- Utilización de crioprotectores en altas concentraciones.
- Muestra vehiculizada en un pequeño volumen de solución, lo cual posibilita aumentar la tasa de descenso térmico y/o disminuir la concentración de crioprotectores. (11)

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

#### **2.4.2.1 Exposición de los embriones a las soluciones de vitrificación.**

Según Palma, G.A.; Brem, G 1993. Describen que las soluciones de vitrificación están formuladas con una combinación de crioprotectores (penetrantes y no penetrantes), un soporte líquido (PBS o medios más enriquecidos como el Tissue Culture Medium (TCM) 199), y macromoléculas (suero, BSA, etc.). contienen altas concentraciones de agentes crioprotectores (5 a 7

M) De este modo, se han obtenido resultados interesantes utilizando BSA, o alcohol polivinílico. (Figura 6) Utilizando exitosamente ciertas proteínas anticongelantes de peces en las soluciones de vitrificación en embriones bovinos y ovinos, así como de origen vegetal. (5)

#### **2.4.2.2 Envasado de los embriones en recipientes apropiados y en pequeños volúmenes.**

En la mayoría de los trabajos publicados se han utilizado pajuelas de 0,25 ml de capacidad. La conservación de ovocitos y embriones en pequeños volúmenes, se han utilizado exitosamente grillas de microscopía electrónica. (Mucci, N, et al.; Palma, G.A.; Brem, G 1993), También se ha descrito la vitrificación de ovocitos y embriones, descargando estas estructuras suspendidas en una gota de solución de vitrificación directamente en N<sub>2</sub> líquido, sin usar ninguno de los elementos de contención descriptos anteriormente. (15,5)

#### **2.4.2.3 Descenso ultrarrápido de la temperatura (vitrificación).**

Este procedimiento puede llevarse a cabo, dependiendo del protocolo adoptado, en un solo paso introduciendo el soporte del embrión directamente en N<sub>2</sub> líquido, o en dos pasos, enfriándolo previamente durante un corto tiempo en los vapores del mismo. (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993), (Figura. 7) La introducción de las pajuelas de 0,25 ml conteniendo soluciones de vitrificación en N<sub>2</sub> líquido permite alcanzar tasas de descenso térmico del orden de los 2.500° C/minuto. Arav *et al.* (1998) diseñaron



un dispositivo (VIT-MASTER<sup>®</sup>, IMT, Israel) mediante el cual la temperatura del N<sub>2</sub> líquido es reducida hasta -210° C aplicando presión negativa. Esto permite aumentar la tasa de descenso térmico principalmente en la parte inicial del enfriamiento (desde 20 hasta -10° C) siendo, seis, cuatro o dos veces mayor que utilizando pajuelas de 0,25 ml. (15,5)

#### **2.4.2.4 Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológicas.**

Según autores como (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993). Coincidien que, el agua vitrificada mantiene la misma distribución iónica y molecular que en estado líquido, por lo cual, si al calentar la muestra el movimiento molecular no se recupera rápidamente, existe el riesgo que se establezcan los procesos de nucleación homogénea o heterogénea, así como de crecimiento a partir de pequeños núcleos formados durante la vitrificación. Por este motivo, durante el calentamiento, se necesita alcanzar altas tasas de ascenso térmico. observaron que los mayores porcentajes de sobrevida embrionaria se obtuvieron cuando el calentamiento se efectuó de modo rápido (2500° C/minuto). En la práctica, estas tasas se logran introduciendo la pajuela en un baño María a 20° C o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39° C durante pocos segundos. (15,5)

#### **2.4.2.5 Extracción de los crioprotectores.**

Según. Díez, C. 2003. Dice que, una vez calentadas las pajuelas, los crioprotectores penetrantes deben ser retirados de los embriones, e inmediatamente, estos deben



rehidratarse. Por ello, se debe utilizar un buffer osmótico, en una concentración suficiente para alcanzar una osmolaridad ligeramente inferior a la de la solución de vitrificación. Este buffer (sacarosa), puede o no estar contenido en la misma pajuela. utilizaron un medio con sacarosa 1 M. La sacarosa previno el rápido influjo de agua al embrión y la muerte celular. En un placa con una solución de TCM 199 + 1 M de sacarosa a 15º C. En ambos experimentos, se obtuvieron aceptables tasas de sobrevida embrionaria.

Mientras que (Calderon, V. 2005). Nos explica que la vitrificación produce fenómenos de degeneración celular en el embrión con relación a embriones no vitrificados, pero que no parecen afectar a los índices de gestación con relación a un sistema clásico de congelación lenta (34). Método Open Pulled Straw (OPS;)

Las ventajas que ofrece el sistema OPS (Método Open Pulled Straw) son:

- Altas velocidades de enfriamiento y calentamiento. Los cambios de temperatura en este sistema son hasta 10 veces más rápidos que en el sistema clásico de vitrificación, con pajuelas estándar. Las razones para que se produzca este hecho son: (Cuadro 4)
- El reducido volumen de solución que tiene cabida en las pajuelas OPS (0,5 ml vs 5 ml en las pajuelas normales).
- El contacto directo entre la fuente de frío o de calor.



- La delgadez de la pared de las pajuelas OPS.
- Rápido y fácil cargado de los embriones en las pajuelas.
- Menos riesgo de lesiones de la zona pelúcida, fenómeno muy corriente cuando los embriones son enfriados o calentados muy rápidamente. ( Cuadro. 5)
- Dilución inmediata de los agentes crioprotectores durante el proceso de calentamiento. (10,6)

## **2.5 SOBREVIDA EMBRIONARIA POSCRIOPRESERVACIÓN EVALUADA *IN VITRO***

La sobrevida embrionaria poscriopreservación puede ser evaluada *in vivo* mediante su transferencia a hembras receptoras previamente sincronizadas, o mediante su cultivo *in vitro*. Dentro de esta última metodología, se pueden tener en cuenta variables tales como la reexpansión del blastocele y/o la protrusión (eclosión) fuera de la zona pelúcida, la fijación a una monocapa de células en cocultivo. (Tabla. 1)

las alteraciones celulares (muerte celular o lesiones de membrana), el número de células embrionarias totales, la morfología y el metabolismo entre otras. (5)

## **2.6 EFECTO DEL DESCENSO TÉRMICO SOBRE LAS ESTRUCTURAS CELULARES.**

### **2.6.1 Crioinjurias.**

Según Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993. En la actualidad ningún protocolo de congelación o vitrificación disponible garantiza la total integridad de las



estructuras así preservadas. No importa “cómo” los embriones sean criopreservados, “siempre alguno muere”. (Tabla. 2)

Durante la criopreservación, los embriones están expuestos a diversos tipos de injurias, las cuales son difíciles de considerar por separado ya que en muchos casos operan en conjunto. Las crioinjurias podrían deberse a: (15,5)

#### **2.6.1.1 Formación de hielo intra o extracelular.**

Durante, (Serrano, C. MV et al, 2002). El proceso de criopreservación, la formación de hielo intracelular puede deberse a tasas de descenso térmico muy altas. Por ello el agua endocelular no tiene tiempo suficiente para alcanzar el medio extracelular, se sobreenfría, alcanza la temperatura de nucleación y finalmente se cristaliza dentro del citoplasma. La tasa de ascenso térmico durante la descongelación y calentamiento no es rápido es posible se produzca hielo intracelular como consecuencia de la temperatura de nucleación, o por crecimiento de pequeños cristales generados en el enfriamiento.

La propagación de cristales se establece mediante un proceso denominado “nucleación catalizada por superficie” sostiene que la propagación de hielo intracelular se propaga a través de uniones intercelulares. Otros autores (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993), sostienen que durante la criopreservación se generarían fuerzas suficientes como para producir



pequeñas lesiones en la membrana plasmática donde se propaga el hielo.(17, 15, 5)

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

La adición o extracción de las sustancias crioprotectoras, así como el propio proceso de congelación (efecto de solución), producen cambios de volumen en las células embrionarias que, dependiendo de su magnitud, pueden afectar su sobrevida poscriopreservación. (Serrano, C. MV; Sierra, R. Bact; Sanchez, J. MVZ; Restrepo, L. Esp.; Olivera, M. MV.,Dr.Sci.Agr. 2002). La disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua puede determinar modificaciones en la composición del medio intracitoplásmico. Según (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993), respecto al aumento excesivo de volumen, pareciera ser crítico el manejo de los embriones inmediatamente después de la descongelación o el calentamiento. La alta concentración de crioprotectores intracelulares puede determinar que las células embrionarias incorporen agua y aumenten excesivamente de volumen, pudiendo dañar estructuras internas o bien desintegrarse por completo. (17, 15, 5)

### **2.6.1.3 Efecto tóxico del crioprotector.**

Según Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993, dicen que el citoesqueleto constituye una compleja red de filamentos proteicos, extendidos a través del citoplasma, que coordinan la organización y el movimiento intracitoplásmico. Sin embargo, los elementos que lo constituyen presentan un



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

Otras alteraciones asociadas (Serrano, C. MV; Sierra, R. Bact; Sanchez, J. MVZ; Restrepo, L. Esp.; Olivera, M. MV., Dr. Sci. Agr, 2002) con la adición de sustancias crioprotectoras son el aumento del espacio perivitelino, el aumento de tamaño mitocondrial y la presencia de vacuolas dentro de las mismas, así como la aparición de signos de degeneración nuclear. (15, 5, 17)

#### **2.6.1.4 Alteraciones de las membranas celulares.**

Las membranas celulares (plasmática y de organelas) son adversamente afectadas por efecto osmótico durante los procesos de criopreservación y su lesión constituye uno de los indicadores más importantes de muerte celular. Cuando el contenido de agua intracelular disminuye por debajo de 10-20%, los componentes celulares permanecen muy juntos entre sí, pudiendo determinar que las membranas pasen de un estado gel de tipo laminar, a uno hexagonal de fase II, aunque este proceso también puede producirse por efecto directo del frío. (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993) En este estado, formado por pequeños cilindros de agua





rodeados por fosfolípidos, las membranas celulares pierden la capacidad para llevar a cabo la mayoría de sus funciones. Otra causa por la cual las membranas pueden ser dañadas la constituye la formación de hielo intracelular. (15,5)

#### **2.6.1.5 Fractura embrionaria o de la zona pelúcida.**

Este tipo de lesiones, probablemente se produzcan debido a diferencias en la expansión de los cristales de hielo lo cual generaría cambios irregulares de volumen en los medios de criopreservación durante un rápido cambio de fase durante la congelación convencional más del 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si las tasas de descenso-ascenso térmico durante la congelación-descongelación no son adecuadamente ajustadas. La utilización de elementos flexibles (pajuelas plásticas) para contener los embriones durante la criopreservación permite amortiguar los cambios de volumen de la solución. (Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G 1993) Durante la vitrificación-calentamiento, al no producirse cambios de fase, la incidencia de este tipo de crioinjuria es menor. Esta lesión es más frecuente durante el calentamiento, y se produciría por el rápido pasaje a través de la temperatura en la cual se forma la fase vítrea (-110 a -135°C). (15,5)

#### **2.5.1.6 Otras crioinjurias.**

Si bien los mecanismos descriptos están bien documentados, estos podrían no ser los únicos por los cuales se produciría daño celular. Morris (2000)





menciona que durante la congelación, los embriones rara vez toman contacto directo con los cristales de hielo, permaneciendo en la fracción no congelada, donde son expuestos a diversos tipos de estrés físico, tales como:

- Daño mecánico como consecuencia de la formación de burbujas debido a un aumento de gas soluble.
- Alteración en los procesos de difusión y ósmosis, producto de un aumento de la viscosidad.
- Desnaturalización proteica, debido a cambios de pH.
- Toxicidad de crioprotectores
- Lesión por el “superenfriamiento”.
- Daños físicos a la membrana por cristales extracelulares formados durante el enfriamiento.
- Toxicidad por la concentración de electrolitos.
- Formación y crecimiento de cristales intracelulares lesivos para la membrana u organelas citoplasmáticas.
- Fracturas celulares.
- Lisis por las diferencias en la Osmolaridad dentro y fuera de la célula (Serrano, C. MV; Sierra, R. Bact; Sanchez, J. MVZ; Restrepo, L. Esp.; Olivera, M. MV., Dr.Sci.Agr, 2002). (15, 5, 17)



## 2.6.2 RESPUESTA CELULAR ANTE LAS CRIOINJURIAS

La criopreservación representa un desafío para las estructuras biológicas, lo cual puede generar distintos tipos de respuesta celular, ya sea a nivel estructural, ultraestructural o metabólico, determinando en muchos casos la muerte celular. (15)

### 2.2.2.1 Cambios estructurales y ultraestructurales relacionados con la criopreservación

Mucci, N, et al 2005. demostraron que la criopreservación estaba asociada con alteraciones morfológicas. Estos autores pudieron observar daños en la zona pelúcida, irregularidades en el ordenamiento espacial de las células embrionarias, restos celulares en el espacio perivitelino y defectos a nivel citoplásmico que daban el aspecto de espacios vacíos.

Mucci, N, et al 2005.; Palma, G.A.; Brem, G (1993), Estos autores observaron que luego de la congelación-descongelación, los embriones presentaron un agrandamiento del espacio perivitelino, disminución del tamaño celular, daños en las microvellosidades y presencia de detritus celulares y gotas lipídicas en el espacio perivitelino. En cambio, en los embriones bovinos producidos *in vitro*, observaron una mayor cantidad de gotas lipídicas, microvellosidades más esparcidas, mitocondrias de aspecto redondeado con crestas transversales o periféricas, o alargadas con crestas transversales, presencia de núcleos con signos de degeneración, detritus celulares en el espacio



perivitelino e inclusive en el blastocele.

Poscriopreservación, la mayoría de estos embriones perdieron su aspecto circular, fue imposible distinguir morfológicamente las células trofoblásticas de las pertenecientes a la masa celular interna así como las uniones celulares y las organelas, y fue posible observar gotas lipídicas y severas alteraciones en la membrana plasmática.

Desde el punto de vista (Gorlach, A 1998.) de la estructura del embrión, se ha observado que el recuento de células totales es menor luego de los procesos de congelación-descongelación y vitrificación-calentamiento, junto a la aparición de detritus celulares en el espacio perivitelino. (15,5,1)

### **2.6.2.2 Cambios metabólicos asociados a la criopreservación**

Se han informado cambios importantes en embriones criopreservados producidos tanto *in vitro* como *in vivo*, observándose por lo general, una disminución en el consumo y utilización de los nutrientes. Luego de la congelación-descongelación, los embriones producidos *in vitro* reducen un 50% la producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa y ésta disminución es particularmente marcada en los embriones de inferior calidad. En los embriones producidos *in vivo*, no se encontraron diferencias, excepto en aquellos de baja calidad.

Otro cambio metabólico asociado con la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro* lo constituye la



disminución en la síntesis de ADN, independientemente del crioprotector utilizado.

De acuerdo a lo descripto, los cambios metabólicos asociados a la criopreservación probablemente se relacionen con alteraciones ultraestructurales como las mencionadas previamente, lo cual modificaría las vías fisiológicas de metabolización de nutrientes pudiendo evidenciarse a través de una disminución en su consumo. (1,15,5)

### III. CONCLUSIÓN

En la actualidad, la congelación convencional constituye la única metodología utilizable en programas de criopreservación de rutina, principalmente en aquellos que involucran la conservación de embriones producidos *in vivo*. Esto podría deberse a que la misma ofrece resultados aceptables y repetibles en gestación y nacimientos, observándose sólo una diferencia del orden del 10% entre los transferidos en fresco y los criopreservados.

Con respecto a la vitrificación, puede concluirse que los resultados de la viabilidad poscongelado son variables según el protocolo y la metodología de la obtención de los embriones. Se han desarrollado muchos protocolos y su aplicabilidad depende mucho del personal especializado.

A pesar de los avances logrados en el estudio de las métodos de criopreservación de embriones bovinos. Quedan muchos aspectos por investigar y resolver ya



que es aquí donde se presentan los mayores problemas para obtener un adecuado desarrollo embrionario. Sin embargo, la relativa complejidad de los protocolos disponibles, la falta de un sistema de transferencia directa probado, y la escasez de resultados provenientes de transferencia de embriones producidos *in vivo*, entre otros, limitan la difusión de la vitrificación como sistema confiable de criopreservación de embriones bovinos.

#### **IV. BIBLIOGRAFIA**

1. Gorlach, A.; Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Editorial. Acribia, SA, Nueva York. 1998 1ra. Edición p. 66-79.
2. Hincapie, J.J.; Brito, R.; Campo, E.; Reproducción animal aplicada: Fundamentos de fisiología y biotecnología. Litocom Editores. Tegucigalpa, Honduras (2005) 2da. Edición. p. 141-142.
3. Neira, A.J. DMV MSc-PhD.; Memorias curso de graduación. Reproducción modulo hembra bovina. (comunicación personal; 22 – 26 noviembre de 2008)
4. Palma, G.A.; Biotecnología de la reproducción. 2 ed. 2008. p. 271-289.
5. Palma, G.A.; Brem, G. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. 1 ed. Munich: enero de 1993. p. 99-118.
6. Calderon, V. Evaluación de la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos congelados por el método Open Pulled Straw. Universidad Católica de Temuco. Facultad de



Recursos Naturales. Escuela de Medicina Veterinaria. TEMUCO 2005. p. 12-13. (sitio en internet). Disponible en. <http://biblioteca.uct.cl/tesis/nelda-calderon/tesis.pdf>. Acceso 17 de mayo de 2011.

7. Colazo, M.G.; Mapletoft, R.J.; Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. Alberta Agriculture and Rural Development, Edmonton, AB, Canadá. WCVM, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canadá. 2007. p. 22-23. (sitio en internet). Disponible en:

<http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n09a03colazo.pdf>. Acceso el 15 de mayo de 2011.

8. De la Fuente, J.; Reproducción asistida en el vacuno de leche congelación. INIA – Reproducción Animal y Conservación Recursos Zoogenéticos. Instituto de Estudios de Postgrado Universidad de Córdoba. Córdoba, Mayo 2009. (sitio en internet) Disponible en:

[http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16\\_11\\_49\\_4\\_CORDOBA.pdf](http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16_11_49_4_CORDOBA.pdf). Acceso el 15 de mayo de 2011

9. D Luca, L.; Método “one step” de criopreservación de embriones. Director técnico. Laboratorio burnet s.a. 2002. (sitio en internet). Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embrionario/07-onestip.htm](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embrionario/07-onestip.htm). Acceso el 11 de mayo de 2011

10. Díez, C.; Congelación de embriones bovinos producidos in vitro. Servicio regional de investigación y desarrollo agroalimentario centro de selección y reproducción animal Gijon (Asturias). 2003. (sitio en



internet). Disponible en:  
[http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/transferplante\\_embrionario/08-congelacion\\_embiones.htm](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transferplante_embrionario/08-congelacion_embiones.htm).

Acceso el 11 de mayo de 2011

**11.** Díaz, C.; Muñoz, M.; Caamaño, N.; Gómez, E.; Biotecnología de la reproducción: producción de embriones bovinos in vitro. Área de Genética y Reproducción. Centro de Biotecnología Animal. SERIDA. 2004. p. 42-45. (sitio en internet) Disponible en:  
<http://www.serida.org/pdfs/4578.pdf>. Acceso el 15 de mayo de 2011.

**12.** José C. Segura-Correa, Rubén C. Montes-Pérez.; Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. Rev Biomed. Vol. 12/No. 3/Julio-Septiembre, 2001. (sitio en internet). Disponible en:  
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2001/bio013q.pdf>. Acceso 17 de mayo de 2011

**13.** Martinez, A. Optimizacion de métodos de criopreservación de bovinos y ovinos. (Tesis Doctoral). Centro de investigaciones reproductivas Peréz compacn. Buenos Aires 2006. p. 74-78.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3986\\_Martinez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3986_Martinez.pdf). Acceso el 11 de mayo de 2011

**14.** Martinez, A.G.; Vacarsel, A.; Vitrificación de embriones bovinos obtenidos in vitro. 1) Unidad de Fertilidad San Isidro (Unifer); 2) Instituto de Ginecología y Fertilidad



(IFER). Reproducción 2008;23:21-3. ( sitio en internet). Disponible en:

[http://revista.samer.org.ar/numeros/2008/n1/4\\_vitrificacion.pdf](http://revista.samer.org.ar/numeros/2008/n1/4_vitrificacion.pdf). Acceso el 15 de mayo de 2011.

**15.** Mucci, N, Aller, J., Cabodevila, J., Kaiser, G., Hozbor, F. y Alberio, R.H.. Taurus, Bs. As., Criopreservación de embriones. Lab. de Producción in vitro de Embriones, Depto. de Producción Animal, E.E.A. INTA Balcarce. Área de obstetricia, Fac. Cs. Vet., UNICEN., Tandil, Argentina, 2005. p. 20-35 (Sitio en internet). Disponible en: [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/transferancia\\_embrionario/14-criopreservacion.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/transferancia_embrionario/14-criopreservacion.pdf). Acceso el 11 de mayo de 2011

**16.** Restrepo, G., M.Sc, Vasquez, N., M.Sc.; Efecto de la maduración in vitrio de oocitos bovinos con suero fetal bovino sobre su actividad mitocondrial pos-desvitrificación. Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera 48N° 7-151, Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biociencias, Medellín, Colombia. 2009. p. 1556-1557. (sitio en internet ) Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/693/69311643004.pdf>.

Acceso 17 de mayo de 2011

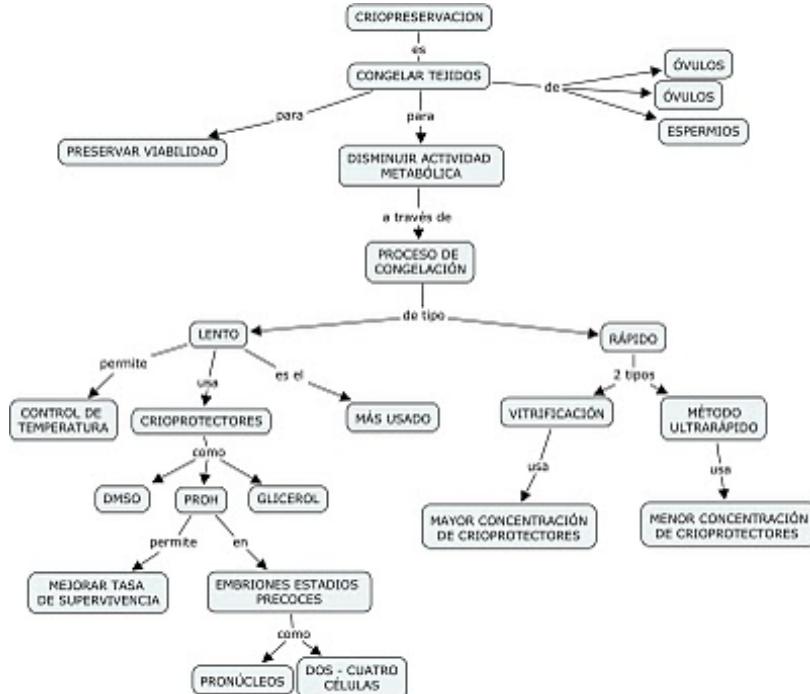
**17.** Serrano, C. MV; Sierra, R. Bact; Sanchez, J. MVZ; Restrepo, L. Esp.; Olivera, M. MV.,Dr.Sci.Agr. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos in vitro.

Grupo Biogénesis, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombi. 2002 p. 287-288 (sitio en internet) Disponible en: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/viewFile/97/96>. Acceso el 11 de mayo de 2011

18. Stringfellow, D.A. and Seidel , S.M. Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones sección IV, IETS, USA. 1998. p. 227-228. (sitio en internet) Disponible en: [http://www.reprobiotec.com/libro\\_rojo/capitulo\\_16\\_iets.pdf](http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_16_iets.pdf). Acceso 17 de mayo de 2011.

## ANEXOS

**Figura. 1** Esquema de los procesos de criopreservación de las soluciones acuosas



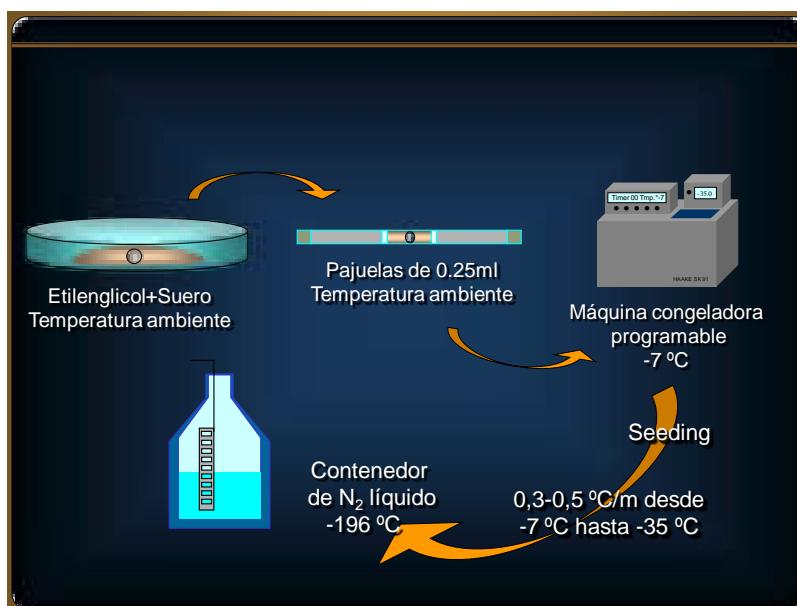
**FUENTE** (Dr. MVZ PhD Gustavo A. Palma)

## Cuadro.1 Primeros nacimientos informados a partir de embriones criopreservados

	CONGELACIÓN	VITRIFICACIÓN
Ratón	1972	1985
Bovino	1973	1987/1992
Conejo	1974	
Ovino	1974	
Caprino	1975	
Equino	1982	
Humano	1983	
Porcino	1991	

Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos).

## Cuadro. 2 Protocolo general de congelación embriones



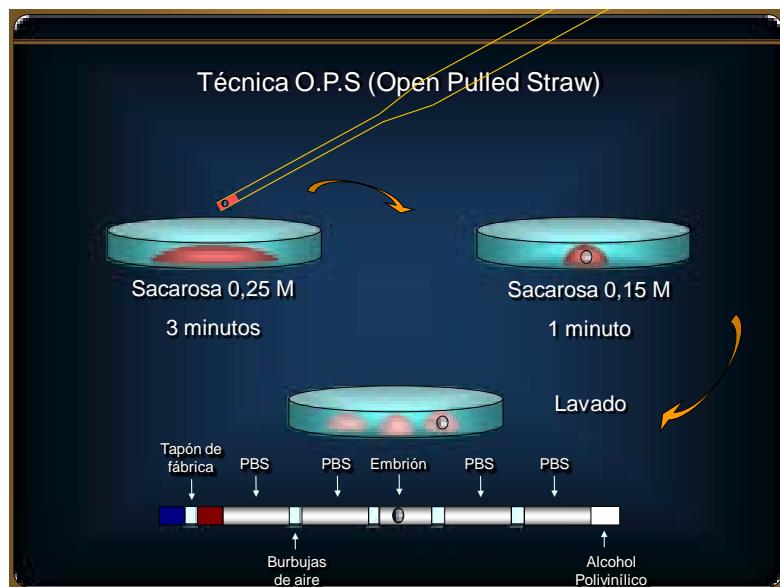
Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

### Cuadro. 3 Tasa de gestación con distintas metodologías de vitrificación.

	%
Agca y col*	63,0
Van der Zwalm en y col	50,0
Lazar y col*	50,0
Kuwayana y col*	60,0
Massip y col	39,1
Vajta y col*	37,0
Ishimori y col	24,3
Ostashko y col	0,0

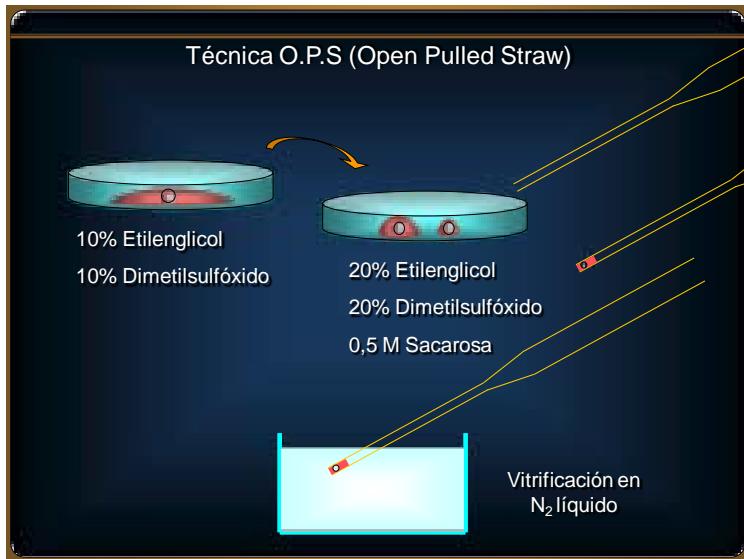
Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

### Cuadro. 4 Calentamiento de embriones en la vitrificación



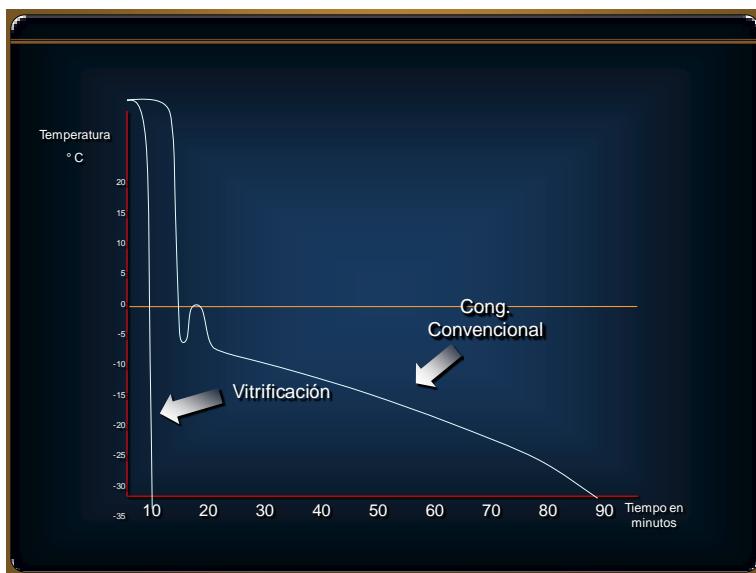
Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

## Cuadro. 5 Vitrificación de embriones



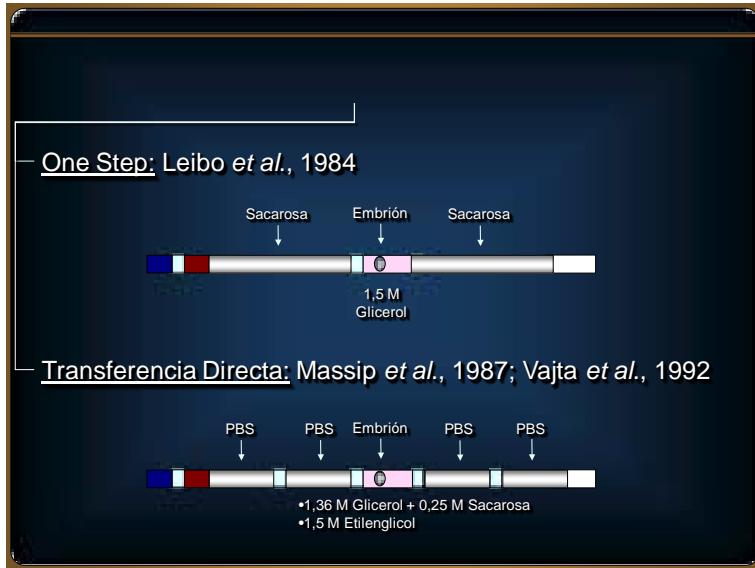
Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

## Cuadro. 6 Curva de enfriamiento de congelación convencional y vitrificación



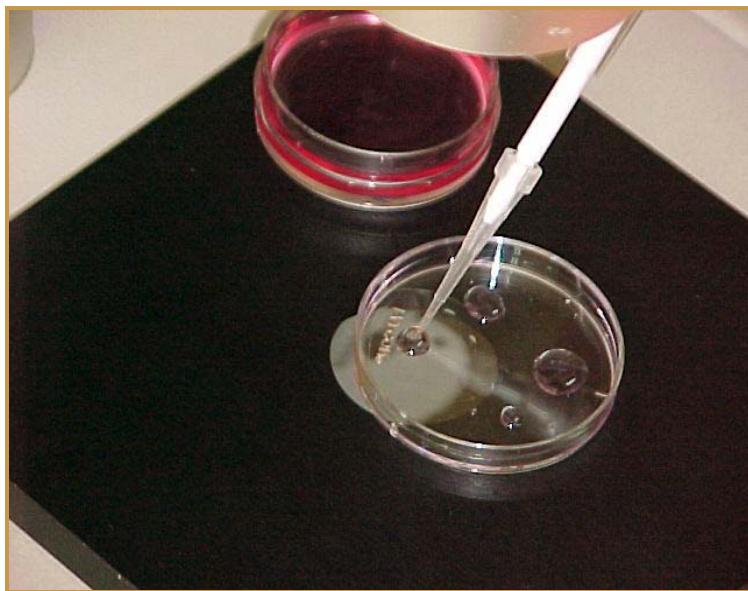
Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

## Cuadro. 7 Envasado de los embriones para congelación



Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

#### Cuadro.8 Extracción de los crioprotectores



Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

#### Cuadro. 9 Tasa de gestación con distintas metodologías de congelación.



<b>ONE STEP</b>	
Leibo	% 26,0
Chupin y col.	41,4
Cabodevila y col.	25,0
<b>TRANSFERENCIA DIRECTA (G + Sacarosa)</b>	
Massip y col.	42,1
Nibart y Humblot	48,5
<b>TRANSFERENCIA DIRECTA (EG)</b>	
Hill	52,0
Nibart y Humblot	50,5
Munar y col.	56,2

Fuente (Dr. Nicolas Mucci, criopreservación de embriones bovinos)

**Tabla 3.** Resultados obtenidos con la transferencia no quirúrgica de embriones refrigerados.

Duración de la refrigeración (horas)	Embriones transferidos (n)	Receptoras preñadas (n) (%)	Referencias
24	19	9 47,3	Refsdal y col., (1988)
48	16	8 50,0	Bezugly y col., (1988)
Hasta 72	222 ++	98 44,1	Lindner Ellis (1985)



FUENTE (Dr. MVZ PhD Gustavo A. Palma)

- De 227 embriones refrigerados, 5 fueron descartados en la evaluación morfológica realizada antes de la transferencia.

**Cuadro. 10** Metodos estándar desarrollado por Wilmot y Rowson (1973)

- 1.- Incorporación de 1,5 Molar de dimetilsulfoxido (DMSO), a temperatura ambiente, en cuatro etapas:
  - a) 0,25 M de DMSO en PBSS, 5 minutos
  - b) 0,5 M de DMSO en PBSS, 5 minutos
  - c) 1 M de DMSO en PBSS, 10 minutos
  - d) 1,5 M de DMSO en PBSS, 20 minutos
- 2.- Enfriado de los embriones a 1°C/minuto hasta -7°C, en tubos de ensayo conteniendo 0,2 ml del medio de congelación ( 1,5 M de DMSO en PBSS).
- 3.- Inducción de la cristalización en el medio de congelación a -7°C mediante un cristal de hielo.
- 4.- Congelación a 0,3°C/minuto hasta -65°C, desde -65°C a 1°C/minuto hasta -120°C.
- 5.- Introducción de los embriones en nitrógeno liquido a -196°C.
- 6.- Retiro de los embriones del nitrógeno liquido y colocación de los mismos en un baño a -100°C desde - 100°C hasta -10°C, utilizando una velocidad



de descongelación de 10°C/minuto.

7.- A -10°C descongelado rápido a temperatura ambiente en un baño a 20°C

8.- Retiro del DMSO en seis etapas a temperatura ambiente:

- a) 1,5 M de DMSO en PBSS, 5 minutos
- b) 1,25 M de DMSO en PBSS, 10 minutos
- c) 1 M de DMSO en PBSS, 10 minutos
- d) 0,75 M de DMSO en PBSS, 10 minutos
- e) 0,5 M de DMSO en PBSS, 10 minutos
- f) 0,25 M de DMSO en PBSS, 10 minutos
- g) Colocar en PBS

9.- Evaluación de la viabilidad cultivando los embriones 24h. en PBSS, a 38°C

FUENTE (Dr. MVZ PhD Gustavo A. Palma)

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



Autor	Origen	CONCENTRACIÓN Y TIPO DE CRIOPROTECTOR	SOBREVIDA (%)
Trounson <i>et al.</i> , 1978	<i>In vivo</i>	Dimetilsulfóxido (DMSO) 1,5 M	25-50
Lehn-Jensen <i>et al.</i> , 1981	<i>In vivo</i>	Glicerol (G) 1,4 M	60-67
Leibo, 1984	<i>In vivo</i>	G 1,5 M	36-67
Voelkel y Hu, 1992a	<i>In vivo</i>	Etilenglicol (EG) 1,5 M	70
Hochi <i>et al.</i> , 1996	<i>In vitro</i>	EG 1,5 M	96,3
Pugh <i>et al.</i> , 1998	<i>In vitro</i>	EG 1,5 M	60,9
Sommerfield y Niemann, 1999	<i>In vitro</i>	EG 1,8 M	30
Khurana y Niemann, 2000	<i>In vitro</i>	G 10%	36
	<i>In vivo</i>	G 10%	80
Kaidi <i>et al.</i> , 2001	<i>In vitro</i>	Gl 1,36 + sacarosa 0,25 M	70-75
Abe <i>et al.</i> , 2002	<i>In vitro</i>	EG 1,8 M	50-74,7



## FUENTE (Dr. MVZ PhD Gustavo A. Palma)

<sup>a</sup>Sobrevida evaluada como reexpansión del blastocele dentro de las primeras 48 hs de cultivo *in vitro* poscalentamiento.

<sup>b</sup>Sobrevida evaluada como protrusión embrionaria poscalentamiento en cultivo *in vitro*.

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

AUTOR	ORI GEN	cONC.	sobrevida
Kuwayama <i>et al.</i> , 1992	<i>In vitro</i>	Glicerol (G) 22,5% + 1,2- Propanodiol 22,5%	56-100 <sup>a</sup>
Ishimori <i>et al.</i> , 1993	<i>In vivo</i>	Etilenglicol (EG) 25% + DMSO 25%	20-85 <sup>a</sup>
Tachikawa <i>et al.</i> , 1993	<i>In vitro</i>	EG 40 % + Ficoll 30% + Sacarosa 0,5 M	0-73 <sup>b</sup>
		GI 40% + Ficoll 30% + Sacarosa 0,5 M	17-81 <sup>b</sup>
		Propilenglicol 40% + Ficoll 30% + Sacarosa 0,5 M	0-24 <sup>b</sup>



Mahmoudzadeh et al., 1995	<i>In vitro</i>	EG 40% + Ficoll 18% + Sacarosa 10,26%	68 <sup>a</sup> ; 37 <sup>b</sup>
Vajta et al., 1996	<i>In vitro</i>	EG 25% + DMSO 25%	84 <sup>a</sup> ; 69 <sup>b</sup>
Dinnyés et al., 1996	<i>In vitro</i>	Gl 6,5 M	78 <sup>a</sup> ; 53 <sup>b</sup>
Vajta et al., 1998 <sup>a</sup>	<i>In vitro</i>	EG 16,5% + DMSO 16,5%+ Sacarosa 0,5 M	94 <sup>b</sup>
Kaidi et al., 1999	<i>In vitro</i>	EG 25% + Gl 25%	53 <sup>b</sup>
Vajta et al., 1999a	<i>In vitro</i>	EG 20% + DMSO 20%	72 <sup>b</sup>
Lazar et al., 2000	<i>In vitro</i>	EG 16,5% + DMSO 16,5% + Sacarosa 0,5 M	46 <sup>b</sup>
Pugh et al., 2000	<i>In vitro</i>	EG 25% + DMSO 25%	70 <sup>b</sup>
Kaidi et al., 2001	<i>In vitro</i>	EG 25% + Gl 25%	80 <sup>a</sup> ; 50-55 <sup>b</sup>
Martinez et al., 2002	<i>In vitro</i>	EG 25% + Gl 25% + Sacarosa 0,5 M	64 <sup>a</sup> ; 45 <sup>b</sup>
Walker y Seidel, 2005	<i>In vitro</i>	EG 40% + Galactosa 0,5 M + 18% Ficoll	40-91 <sup>a</sup>

FUENTE (Dr. MVZ PhD Gustavo A. Palma)

**Tabla 4.** Eficacia de los métodos de crioconservación de embriones bovinos producidos *in vitro*.



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

	Crioprotector	Dilución	% Gestación
* transferencia de 2 embriones/receptora			

FUENTE: (Carmen Díez Monforte. Área de Genética y Reproducción. Centro de Biotecnología Animal. SERIDA)

**Figura. 2 Partes de termo de nitrógeno**



Fuente. (Instituto Nacional de Tecnología y Agricultura. INTA,; Laboratorio Biotecnología Reproducción Argentina)

**Figura. 3 Refrigeradora donde se ubican los embriones para congelación**



Fuente. (Instituto Nacional de Tecnología y Agricultura. INTA,; Laboratorio Biotecnología Reproducción Argentina)

**Figura. 4** Micromanipulador para embriones



Fuente. (Instituto Nacional de Tecnología y Agricultura. INTA,; Laboratorio Biotecnología Reproducción Argentina)

**Figura. 5** Pipetas



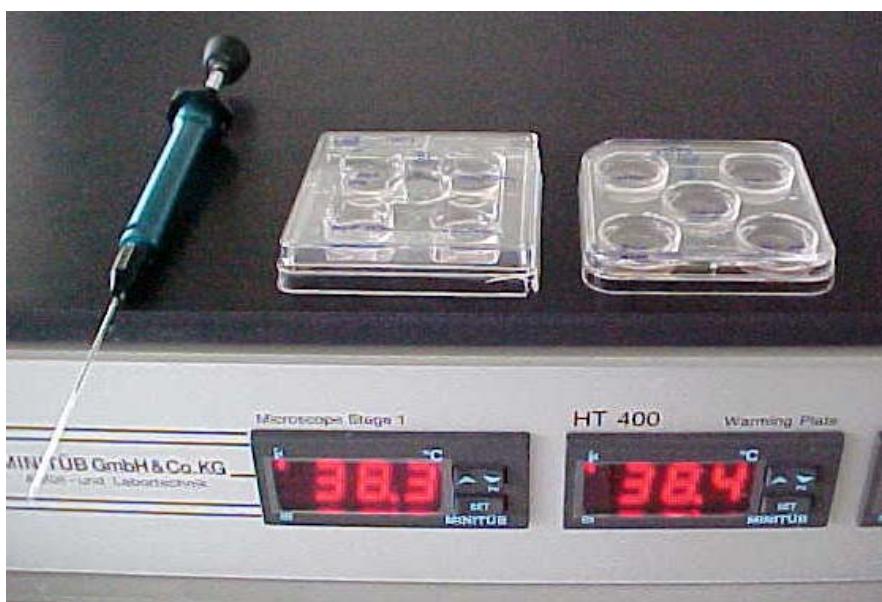
Fuente. (Instituto Nacional de Tecnología y Agricultura. INTA,; Laboratorio Biotecnología Reproducción Argentina)

**Figura. 6** Microscopio invertido luz ultravioleta



Fuente. (Instituto Nacional de Tecnología y Agricultura. INTA,; Laboratorio Biotecnología Reproducción Argentina)

**Figura. 7** Platina térmica



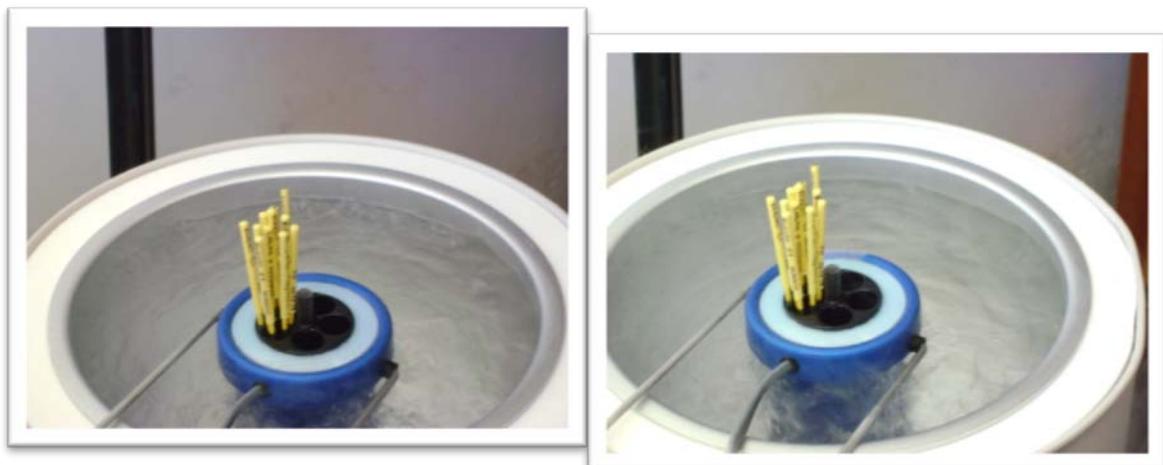
Fuente. (Instituto Nacional de Tecnología y Agricultura. INTA,; Laboratorio Biotecnología Reproducción Argentina)

**Figura. 8** Arranque



Fuente (Dr. Jaime Maldonado)

**Figura. 9** Congelación Inicial



Fuente (Dr. Jaime Maldonado)

**Figura. 10** Equipo para crioconservación



Fuente (Dr. Jaime Maldonado)

**Figura. 11** Inicio de la congelación



Fuente (Dr. Jaime Maldonado)