

La vitrificación como alternativa de conservación de embriones producidos *in vitro*

John Jairo Giraldo Giraldo¹; Sebastián Ordóñez Ramírez²; Andrea Álvarez Arango³.

■ Resumen

La criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro* facilita el uso de programas de transferencia de embriones, el establecimiento de bancos de germoplasma con acceso permanente a material genético de un determinado individuo o raza y las biotecnologías asociadas como clonación y transgénesis (Albarracín, 2005). Consecuentemente, esto ha generado la necesidad de conservar los embriones excedentes de la producción *in vitro*. Sin embargo, la criopreservación de esta clase de embriones, por medio de métodos convencionales de congelamiento, no ha alcanzado tasas de sobrevivencia satisfactorias (Vajta, 2000), lo que ha llevado a la utilización de otros métodos como la vitrificación. Este método, con curvas de enfriamiento superiores a las de la congelación convencional, permite la reducción del tiempo de exposición del embrión en los puntos críticos de temperatura, disminuye los daños térmicos y mecánicos causados durante la formación de hielo y aumenta la viabilidad de los embriones, posterior a su devitrificación (Lazar, 2000; Arteaga et al., 2002; Vajta y Kuwayama, 2006, Mucci et al., 2006).

Palabras clave: Criopreservación, criotolerancia, embriones

Vitrification as an alternative to conserve *in vitro* produced embryos

■ Abstract

Cryopreservation of bovine embryos produced *in vitro* eases the use of embryo transfer programs, establishing germplasm banks with a permanent access to genetic material of a determined individual or race and the biotechnologies related such as cloning and transgenesis (Albarracín, 2005). Therefore, this has brought a necessity to conserve the embryos remaining from the *in vitro* production. Nevertheless, the cryopreservation of such embryos by the use of conventional freezing methods has not

¹ Zootecnista; Esp en Reproducción Bovina, UNC-IRAC; Magíster en Ciencias – Biotecnología Animal, U Nal Medellín. Docente Investigador Grupo de Investigación en Producción, Transformación y Desarrollo Agropecuario, Corporación Universitaria Lasallista

² Industrial Pecuario. Est. Medicina Veterinaria, Corporación Universitaria Lasallista

³ Estudiante de Medicina Veterinaria, Corporación Universitaria Lasallista

Correspondencia: jogiraldo@lasallistadoctentes.edu.co

Artículo recibido: 29/10/2011; Artículo aprobado: 14/03/2012.



reached satisfactory survival rates (Vajta, 2000), so other methods, such as vitrification, have been being used. This method has cooling curves above those from the traditional freezing, allows to reduce the embryo's exposition time in the critical temperature points, reduces thermal and mechanic damage caused during the formation of ice and increases the feasibility of the embryos after the devitrification (Lazar, 2000; Arteaga et al., 2002; Vajta and Kuwayama, 2006, Mucci et al., 2006).

Key words: Cryopreservation, cryotolerance, embryos.

A vitrificación como alternativa de conservação de embriões produzidos *in vitro*

■ Resumen

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* facilita o uso de programas de transferência de embriões, o estabelecimento de bancos de germoplasma com acesso permanente a material genético de um determinado indivíduo ou raça e as biotecnologias associadas como clonagem e transgênesis (Albarracín, 2005). Conseqüentemente, isto gerou a necessidade de conservar os embriões excedentes da produção *in vitro*. No entanto, a criopreservação desta classe de embriões, por meio de métodos convencionais de congelamento, não atingiu taxas de sobrevivência satisfatórias (Vajta, 2000), o que levou à utilização de outros métodos como a vitrificação. Este método, com curvas de esfriamento superiores às do congelamento convencional, permite a redução do tempo de exposição do embrião nos pontos críticos de temperatura, diminui os danos térmicos e mecânicos causados durante a formação de gelo

e aumenta a viabilidade dos embriões, posterior a sua devitrificação (Lazar, 2000; Arteaga et al., 2002; Vajta e Kuwayama, 2006, Mucci et al., 2006).

Palavras importantes: criopreservação, crio tolerância, embriões.

■ Introducción

Durante los últimos 20 años, se ha observado que la producción de embriones bovinos ha crecido de forma progresiva, en especial, en el área de la producción *in vitro* (PIV), lo que ha hecho que esta se convierta en una técnica importante no solo en el ámbito científico sino también en el comercial. La necesidad de conservar los embriones excedentes de dicha producción, ha impulsado la investigación hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación de esta clase de embriones y que por los métodos convencionales de congelamiento, no han alcanzado tasas de sobrevivencia satisfactorias (Vajta, 2000), debido a sus características físicas. Dentro de las nuevas aplicaciones de la criobiología, el método de la vitrificación se muestra como alternativa para mejorar la sobrevivencia de los embriones producidos *in vitro*, este método con curvas de enfriamiento superiores a las de congelamiento, va a permitir la reducción del tiempo de exposición del embrión en los puntos críticos de temperatura, disminuyendo así los daños térmicos y mecánicos causados durante la formación de hielo y aumentando la viabilidad de los embriones, posterior a su vitrificación (Lazar, 2000; Vajta y Kuwayama, 2006, Mucci et al., 2006). No obstante, es importante resaltar que, a pesar del alcance conseguido con esta técnica hasta hoy, aún es necesario el desarrollo de nuevos métodos y la búsqueda de nuevas perspectivas que optimicen la vitrificación de embriones producidos *in vitro* (Camargo et al., 2004).

■ Producción *in vitro* de embriones

Con el nacimiento del primer bovino producido *in vitro* por Brackett et al en 1981, la técnica de fertilización *in vitro* comenzó a ser reconocida mundialmente desde hace más de 20 años. Sin embargo, su estado del arte hacía que fuera una metodología aún restringida a la parte experimental, además de que sus condiciones de mercado en la década de los 80 y 90 limitaban aun su aplicación comercial (Viana y Camargo, 2007). En tanto, con la introducción de la transferencia de embriones, se permitió el aumento no solo de la producción sino la posibilidad de distribución de este tipo de embriones. A escala mundial, el crecimiento de la técnica ha sido evidente, como lo demuestran los datos reportados por la International Embryo Transfer Society IETS (Thibier, 2001, 2007), en donde se observa que el número de transferencias de embriones frescos producidos *in vitro* pasó de 41.761 en el 2000 a 291.845 embriones en el 2006 (figura 1). En Suramérica, Brasil es uno de los países con mayor producción *in vitro* de embriones, lo que le ha permitido destacarse dentro del mercado mundial. Su crecimiento en estos últimos años

ha sido igualmente significativo, al pasar de 12.597 embriones producidos y transferidos en el 2000 a más de 196.000 en el 2006 (Viana y Camargo, 2007).

Argentina, por su parte, ha tenido una producción *in vitro* de embriones menor en comparación con otros países, debido a que la técnica aún no ha sido masificada de la misma manera, además algunas de las razas bovinas que allí se encuentran tienen tasas de recuperación ovocitaria bajas, y las inadecuadas condiciones de transporte y bajo número de receptoras hacen que no sea favorable su producción en grandes cantidades (Cutaia y Bó, 2007). Por todas estas razones, es importante que se continúe haciendo investigación en esta área, con el fin de superar ciertas limitaciones inherentes de la técnica, y conseguir optimizar un sistema de criopreservación que permita el fácil transporte y distribución de los embriones, en países donde aún es difícil la diseminación de la técnica, así como el almacenamiento de los embriones excedentes en los procesos donde el número de embriones supera el número de receptoras (Cutaia y Bó, 2007; Viana y Camargo, 2007).

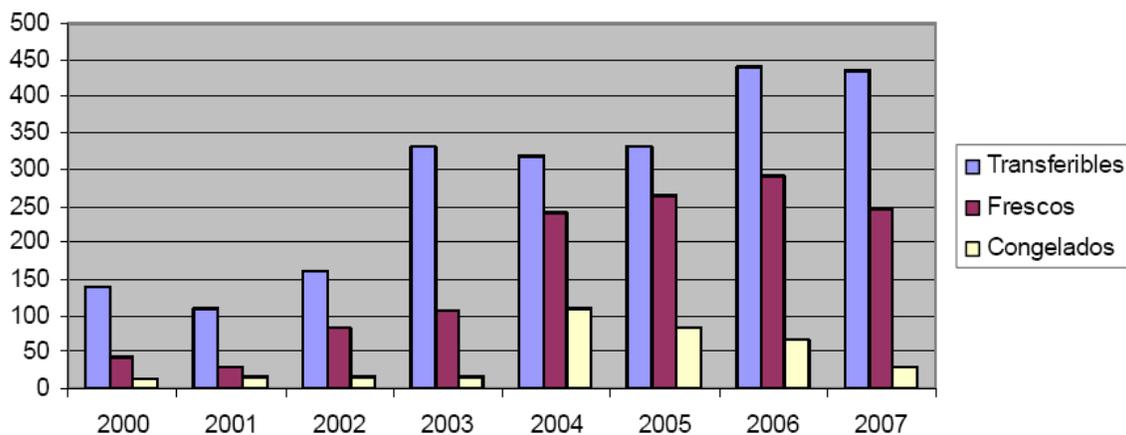


Gráfico 1. Total de embriones transferibles y transferidos frescos y congelados según el año de producción en el mundo. Fuente: Thibier, 2001



■ Criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones se ha dado como consecuencia de un aumento en la producción de animales de alto valor genético, así como de la necesidad de conservación y comercialización de este material alrededor del mundo (Vajta, 2000). Con el desarrollo de considerables avances en la reproducción asistida de animales, como son la producción *in vivo* e *in vitro*, la transferencia y el sexaje de embriones, así como la transferencia nuclear y la clonación, el número de embriones producidos se ha incrementado, lo que ha creado la necesidad de almacenar embriones excedentes, por largos periodos de tiempo, para mantener su viabilidad. De igual forma, la posibilidad de generar bancos genéticos ha permitido no solo el almacenamiento sino que también ha facilitado el transporte y la programación de actividades para la utilización de dichas estructuras (Celestinos y Gatica, 2002). Uno de los principios más importantes de la criopreservación de embriones es poder permitir el almacenamiento de las estructuras a bajas temperaturas (-196°C), intentando mantener su integridad, a través de la remoción del máximo volumen posible de agua antes de su congelamiento, para evitar la formación de hielo (Seidel Jr, 1986). Dentro de los métodos más importantes de la criopreservación se encuentran el de congelamiento y el de vitrificación. El método de congelamiento fue el primero en ser introducido, y es hoy el más utilizado comercialmente (Vajta, 2000). Su curva de congelación lenta permite mantener el equilibrio entre los factores que pueden causar daño celular, como son la formación de cristales de hielo, la fractura del embrión, el daño tóxico y osmótico, así como las alteraciones de las organelas intracelulares y del citoesqueleto (Dobrinisky 1996; Vanderzwalmen et al., 2002; Vajta y Kuwayama, 2006;). Durante el procedimiento de la congelación lenta, los embriones normalmente van a ser equilibrados dentro de bajas concentraciones

de crioprotectores, en pajillas irradiadas de 0.25 ml, con tasas de refrigeración entre los 0.3 a 1 °C/min, hasta alcanzar los -30 a -35°C, para posteriormente poder ser sumergidos en el nitrógeno líquido. Por su parte, la vitrificación es una metodología, definida como la solidificación de un líquido, producida, no por la cristalización, sino por extrema elevación de la viscosidad durante el enfriamiento (Fahy et al., 1984). Su curva de enfriamiento es más rápida (≈ 2500 °C/min) y necesita de la presencia de crioprotectores a una mayor concentración, que permitan la formación del llamado estado vítreo y disminuyan los daños químicos y mecánicos causados por el paso entre los puntos críticos de congelación (Dobrinisky, 1996; Martino et al., 1996). La formación del estado vítreo evitará tales daños, al promover la distribución iónica del líquido, impidiendo la formación de cristales de hielo (Rall y Fahy, 1985; Arav, 1992; Kasai, 2002).

■ Vitrificación contra congelamiento

El congelamiento convencional tiene una ventaja comparativa frente a los otros métodos de criopreservación, al ser una metodología que permite la utilización de bajas cantidades de crioprotectores y la transferencia directa de los embriones después del descongelamiento (Volkel y Hu, 1992). Sin embargo, su habilidad para prevenir la formación de hielo aún es limitada, y sus resultados en la criopreservación de embriones *in vitro* han sido variables (Massip et al., 1995; Hasler et al., 1997; Hochi et al., 2001; Kaidi et al., 2001), y menores en comparación con los datos obtenidos en embriones *in vivo* (Alvarenga et al., 2007; Dinnyes y Nedambale, 2009). La razón por la cual existe esta variación en la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, en comparación con los producidos *in vivo*, es debida probablemente a las características físicas propias de este tipo de embriones, que hacen que sean más sensibles al momento de ser expuestos a bajas temperaturas (Vajta

et al., 1997; Dinnyes y Nedambale, 2009; Rodríguez, 2009). Entre dichas características, se encuentran diferencias no solo morfológicas sino también fisiológicas, como: el aumento en el número de vacuolas, una mayor fragilidad de su zona pelúcida, una menor compactación embrionaria, un menor número de blastómeras, sobre todo en la masa celular interna (Rizos et al., 2002), alteraciones en la expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000; Rizos et al., 2003; Laowtammathron et al., 2005), una mayor incidencia de la apoptosis y un aumento en el alto contenido citoplasmático de lípidos (Massip et al., 1995).

Por estas razones, y en especial, el contenido lipídico, el método de congelamiento convencional afecta considerablemente las tasas de viabilidad en este tipo de embriones (Pereira y Márquez, 2008). El aumento de los tiempos de exposición, debido al descenso progresivo de la temperatura, durante el congelamiento, va a hacer que el embrión permanezca un tiempo mayor en la franja de temperatura termotrópica de la transición de los lípidos, lo que lo afecta considerablemente (Zeron et al., 1999). Mucci y colaboradores, en 2006, confirmaron esta observación, al comparar la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*, por medio de las dos metodologías, y reportan un aumento en la viabilidad a las 72 horas post-descongelamiento, de los embriones que fueron conservados por medio de la vitrificación (114/265; 43%) en comparación con los que fueron congelados (33/275; 12%). De igual forma, varios autores reportan el aumento de las tasas de sobrevivencia después de la vitrificación, al comparar las dos metodologías (Dinnyes et al., 1995; Hasler et al., 1997; Agca et al., 1996; Vajta et al., 1997; O'Kearney Flynn et al., 1998; Lane et al., 1999; Sommerfeld y Niemann, 1999; Kaidi et al., 2001; Mezzalira et al., 2004; Alvarenga et al., 2007). Además, la vitrificación es una técnica que tiene otras ventajas comparativas frente al congelamiento tradicional, al utilizar

procedimientos más simples, no necesita de equipos costosos y requiere de poco tiempo para su realización (Baril et al. 2001).

■ Vitrificación

La vitrificación corresponde a una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene agentes crioprotectores y los embriones (exposiciones cortas a altas concentraciones de crioprotectores de aproximadamente 4-6 mol/L), que produce una solidificación para formar un estado vítreo o similar al cristal, sin la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento a tasas muy rápidas (tasa de congelación $>2.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta $14.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$), y permanece en este estado durante todo el proceso de cambio de temperatura (Mavrides y Morrol, 2002; Shaw y Jones, 2003; Molina et al., 2004; Albarracín, 2005).

Debido a sus posibles efectos benéficos, esta metodología ha tomado gran importancia en la criopreservación no solo de embriones *in vitro*, sino también de embriones producidos *in vivo*. Sin embargo, desde el primer procedimiento realizado con éxito en embriones mamíferos por Rall y Fahy en 1985, la vitrificación ha sufrido múltiples modificaciones, en el intento por simplificar sus procedimientos y mejorar las tasas de viabilidad de las estructuras. Inicialmente, varios de los estudios fueron enfocados en la disminución de los efectos tóxicos y osmóticos causados por las altas concentraciones de los crioprotectores (Kasai y Mukaida, 2004). La vitrificación, al ser una técnica que consiste en la criopreservación a través del aumento de la viscosidad de las soluciones crioprotectoras, necesita de concentraciones de crioprotectores mayores (4-8 M) a las utilizadas normalmente en el congelamiento (1-2 M). Por lo tanto, la disminución de estos efectos deletéreos va a ser lograda a través de la utilización de crioprotectores



menos tóxicos, y el establecimiento de volúmenes y niveles de concentración menores, así como su temperatura y tiempos de exposición (Liebermann et al., 2003). El uso de soluciones crioprotectoras con bajo peso molecular es una de estas estrategias. Los crioprotectores, al tener una mayor permeabilidad, van a permitir la reducción de los tiempos de exposición, y la minimización de los niveles de concentración, previniendo el daño osmótico causado en las células (Kasai y Mukaida, 2004). Entre los crioprotectores de bajo peso molecular, el más ampliamente utilizado es el etilenglicol (EG) (Massip, 2001). Sin embargo, varios experimentos sugieren que crioprotectores como 1-2 propanediol (PROH), glicerol (GLY), dimetilsulfoxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y sus posibles combinaciones con otros crioprotectores son igualmente candidatos para ser empleados en la vitrificación de embriones (Ishimori et al., 1992; Hubalek, 2003). De igual forma, la asociación de uno o más agentes crioprotectores, con características más estables, permitirá la utilización de soluciones más simples y la reducción de la toxicidad específica de los agentes. De acuerdo con algunos investigadores, la permeabilidad de la combinación de crioprotectores es mayor que la de sus componentes de forma individual (Vajta y Nagy, 2006).

La asociación más comúnmente utilizada en vitrificación es la compuesta por EG y DMSO (Mezzalira et al., 2004; Vajta y Nagy, 2006); sin embargo, esta puede ser reemplazada por otro tipo de asociaciones de agentes crioprotectores, como el EG y PROH, con la que se obtienen excelentes resultados en la vitrificación de embriones producidos *in vitro* (Vieira et al., 2008).

La adición de crioprotectores no permeables, tales como disacáridos (sucrosa, trehalosa) o macromoléculas (Ficoll, polivinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), igualmente, va a ayudar en la reducción de la toxicidad de los crioprotectores, ya que contribuye en

la disminución de los niveles de crioprotector dentro de las células (Liebermann, 2003; Kasai y Mukaida, 2004).

Por otro lado, los grandes volúmenes de crioprotectores también son limitantes de las tasas de enfriamiento. Los primeros contenedores utilizados con éxito en la vitrificación de embriones fueron las pajuelas de inseminación, las cuales usaban grandes volúmenes ($>20 \mu\text{L}$), que solo alcanzaban tasas de enfriamiento de $2.500^\circ\text{C}/\text{min}$ (Palasz y Mapletof, 1996). Posteriormente, con la invención de contenedores de menor volumen ($<5 \mu\text{L}$), asociados con el contacto directo con el nitrógeno líquido, se consiguió aumentar las tasas de enfriamiento hasta casi los $30.000^\circ\text{C}/\text{min}$ (He et al., 2008). La mayoría de estos contenedores, además, permitió la disminución de las concentraciones de los crioprotectores, y del daño tóxico y mecánico causado por la vitrificación. Entre los innumerables dispositivos creados están: el tamaño mínimo de la gota (MDS) (Arav, 1992), los electron microscope grids (EM) (Martino et al., 1996), las pajillas abiertas y estiradas *open-pulled straw* (OPS) (Vajta et al., 1998), los *cryoloop* (Lane et al., 1999), el volumen mínimo de congelación (MVC) (Hamawaki et al., 1999), el sistema de hemi-pajuela (Vanderzwalde et al., 2000), la superficie sólida de vitrificación (Dinnyes et al., 2000), las *closed pulled straw* (CPS) (Chen et al., 2001), *flexipet denuding pipette* (FDP) (Liebermann et al., 2002), las *superfinely open-pulled straw* (SOPS) (Isachenko et al., 2003), las micropipetas plásticas de diámetro fino (Cremades et al., 2004), *cryoTip* (Kuwayama et al., 1992) y *cryolop* (Kuwayama et al., 1992). Dentro de estos, el envase más usado comúnmente es el método de la OPS que alcanza tasas de enfriamiento de más de $20.000^\circ\text{C}/\text{min}$, y disminuye los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta et al., 1998). Sin embargo, posteriores modificaciones de este modelo consiguieron aumentar aún más las tasas de enfriamiento, al utilizar para su fabricación

diferentes materiales distintos al plástico. El plástico, debido a sus características físicas, tiene una baja conductividad de calor, que limita las tasas de congelamiento; por lo tanto, el uso de otros materiales con mayor conductividad como el vidrio (Mezzalana et al., 1999), el metal (Bunn et al., 2006), o el cuarzo (He et al., 2008) permite aumentar el intercambio de calor y las tasas de enfriamiento, alcanzando velocidades de casi 30.000°C/min. Varios autores, demostraron esta eficiencia, al alcanzar mayores tasas de congelamiento con micropipetas de vidrio (GMP) en comparación con las OPS, y mayores tasas de sobrevivencia pos devitrificación, debido a una mayor conductividad y la utilización de un menor volumen de crioprotectores (Kong et al. 2000; Cho et al., 2002). Por último, otra de las estrategias para aumentar la velocidad de congelamiento ha sido la reducción de temperatura del nitrógeno líquido. El uso de nitrógeno súper-congelado reduce el punto de ebullición, mediante la estabilización a través de la presión negativa; también reduce el efecto aislante del vapor del nitrógeno y permite una mayor eficiencia en la transferencia de calor entre las muestras y el nitrógeno líquido (Vieira et al., 2008). De esta forma, el nitrógeno líquido va a alcanzar temperaturas de -210°C, y permitirá alcanzar curvas de congelamiento más rápidas, que reduzcan la posibilidad de desvitrificación y recristalización de las muestras durante el descongelamiento (Arav et al., 2003; Santos et al, 2006).

La tasa de congelación es uno de los principales determinantes de la supervivencia celular durante la criopreservación. La congelación muy lenta puede causar la muerte celular por su exposición a soluciones concentradas, mientras

la congelación rápida puede causar muerte celular por formación de cristales de hielo (Luster, S., 2004). En la vitrificación de oocitos, algunos autores reportan que las tasas de supervivencia para bovinos y humanos (Picton et al., 2002) son cercanas al 70%.

Se ha demostrado que el método de vitrificación es superior al procedimiento de congelación lenta convencional para criopreservación de embriones de bovinos, humanos y otras especies animales (Otoi et al., 1998; Molina et al., 2004). Según Massip (2003), la vitrificación, especialmente usando tasas muy altas de enfriamiento en embriones suspendidos en volúmenes extremadamente pequeños y alta concentración de crioprotectores, es vista como el método más apropiado, para lo cual se han desarrollado nuevos métodos que pueden maximizar la tasa de congelación, mantener la viabilidad de las células, prevenir el estrés mecánico, y facilitar la manipulación durante la criopreservación y la recolección (Tan, 2004). Sin embargo, los protocolos de vitrificación pueden causar un choque osmótico severo que puede comprometer su sobrevivencia post-descongelación y potencial de desarrollo (Picton et al, 2002).

Para la vitrificación, el tamaño de la muestra debe ser lo más pequeña posible para aumentar la velocidad de congelación. Para dicho fin se han descrito diversos soportes físicos para la vitrificación como pajillas tradicionales para 0,25 ml, *open pulled straw* (figura 2), *closed pulled straw*, *flexipet-denuding pipette*, microgotas, gradillas de cobre de microscopía electrónica, sistema hemistraw, nylon mesh, y cryoloops.

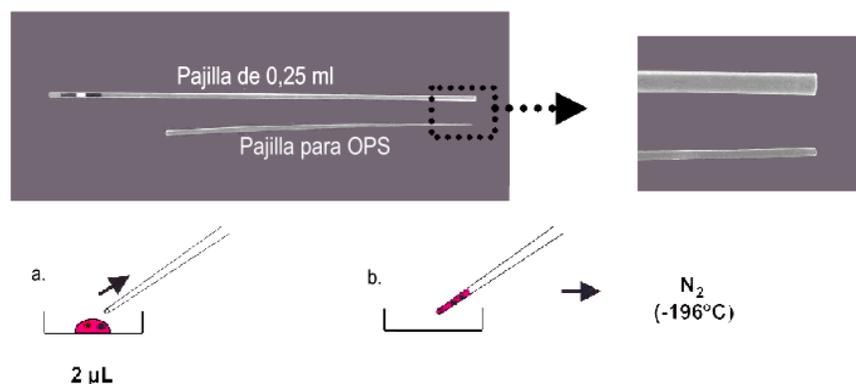


Figura 2. Pajilla abierta y estirada (*Open pulled straw*, OPS), pajilla de 0,25ml. a. Gota de 2 μ l de crioprotector con los oocitos. b. Montaje de la gota por capilaridad en la pajilla y su paso directo al nitrógeno líquido. Fuente: adaptado de Guignot (2005).

■ Nuevas perspectivas

Es claro que la criopreservación de embriones *in vitro* está ligada a la calidad en el proceso de producción. Por lo tanto, para poder generar métodos más eficientes de criopreservación es necesario no solo el desarrollo de nuevas tecnologías sino también de modificaciones dentro del proceso de producción que permitan una mayor sobrevivencia de los embriones al momento de la vitrificación (Rodríguez et al, 2011). La modificación de los medios de cultivo puede ser una de las opciones. El desarrollo de mejores sistemas de cultivo va a mejorar considerablemente la calidad embrionaria y, por tanto, la criotolerancia de los embriones, al punto de que metodologías como el sistema de congelamiento convencional pueden ser igualmente utilizadas con éxito en la criopreservación de este tipo de embriones (Nedambale et al, 2006). Varios estudios han demostrado que la producción de embriones *in vitro* en cierto tipo de medios de cultivo (Leibo y Loskutoff, 1993; Mahmoudzadeh et al, 1994; Massip et al, 1995) o a través del co-cultivo con células de la granulosa o células vero (Leibo y Loskutoff, 1993; Desai et al, 2000) puede aumentar las tasas de sobrevivencia

de los embriones devitrificados. El suero y la composición de lípidos en los sistemas de cultivo pueden cumplir un papel importante de la criotolerancia de los embriones. Se ha comprobado que la presencia del suero en el suplemento de los medios de cultivo puede influenciar la composición química de los embriones (Saha y Suzuki 1997) y su sensibilidad a la criopreservación (Dinnyes et al. 1995). Los medios de cultivo libres de suero permiten el desarrollo y la eclosión de casi el 100% de los embriones después de la vitrificación (Hochi et al, 1996), así como la reducción del contenido citoplasmático de lípidos en los embriones con etosulfato de fenazina (PES) (Seidel, 2006), la adición de la hialurona (Palasz et al. 2008) o ácido linoleico (Hochi et al. 2001; Laowtammathron et al. 2005; Pereira y Márquez, 2008) aumenta la criotolerancia de los embriones bovinos *in vitro* cultivados en medios de cultivo libres de suero. Por otro lado, se puede reducir igualmente el alto nivel de lípidos que se encuentra en los embriones producidos *in vitro*, por medio de la remoción de lípidos por centrifugación o a través de la micro-manipulación, aumentando así las tasas de sobrevivencia de los embriones criopreservados (Silva y Berland, 2004). Por otro lado, la formación de radicales libres durante la

criopreservación puede causar daño celular y disminuir la viabilidad de los embriones, razón por la cual, la adición de EDTA (0.1mM) y/o glutathione (GSH; 1 mM) en el cultivo antes de la vitrificación pueden llegar a mejorar el desarrollo de los embriones, al disminuir la oxidación de las membranas celulares insaturadas de lípidos, promoviendo su integridad celular. Además, la adición de agentes como el EDTA y el β mercaptoetanol puede llegar a aumentar sustancialmente las tasas de sobrevivencia aun en ambientes con bajos niveles de oxígeno, al proteger al embrión de los radicales libres y la autoperoxidación de lípidos (Nedambale et al, 2006). Otras de las estrategias de optimización del proceso de vitrificación pueden realizarse por medio de la modificación de las características propias del embrión antes de ser expuesto al proceso de criopreservación. Por ejemplo, la inyección de trealosa en ovocitos aumenta la protección de las estructuras y disminuye los efectos deletéreos, debido a la toxicidad

de los crioprotectores (Eroglu et al, 2003); la reducción artificial del fluido blastocélico puede reducir el shock osmótico, los problemas de permeabilidad y la formación de cristales de hielo (Vanderzwalmen et al, 2002; Son et al, 2003; Chen et al, 2005), y la estabilización del citoesqueleto con la adición de citocalasina B (Dobrinsky et al 2000; Carvalho, 2006) reduce la despolimerización de los microfilamentos y microtúbulos, mejorando las tasas de sobrevivencia de los embriones criopreservados. Sin embargo, se requieren estudios en los que se evalúe la sobrevivencia embrionaria por más tiempo y la implementación de otras pruebas que validen la viabilidad embrionaria. Además, existe la necesidad de evaluar los efectos sobre estructuras celulares como la membrana celular, el citoesqueleto y las mitocondrias, su potencial efecto genotóxico y la determinación de la tasa de implantación de embriones devitrificados, que permitan adoptar este protocolo en la criopreservación de embriones bovinos.

■ Referencias

Agca, Y; Monson, R; Northey D; Schaefer, D. y Rutledge, J. (1996). Postthaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. 45:175.

Albarracín, J. (2005). Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: estudio estructural de cromosomas, microtúbulos, y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

Alvarenga, M; Fernandes, C. y Landim-alvarenga, F. (2007). Criopreservación of equine embryos. *Acta Sci Vet.*; 35(3): 799-809.

Arteaga, X; Shüler, C. y Gatica, R. (2002). Primer nacimiento de un ternero en Chile por

transferencia de un embrión vitrificado. En: XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal. Chillán – Chile. 201-202.

Arteaga, X; Shüler, C. y Gatica, R. (2002). Primeros resultados de sobrevivencia de embriones bovinos vitrificados a los 7 y 10 días de cultivo in vitro. En: XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal. Chillán - Chile. 203-204.

Arav, A. (1992). Vitrification of oocytes and embryos In: LAURIA, A., GANDOLFI, F., Embryonic Development and Manipulation in Animal Production. Port Press, London and Chapel Hill. 22: 255-264.

Arav, A; Zeron, Y. y Ocheretny, A. (2003). A new device and method for vitrification increases the coolingrate and allow successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 53: 258.

Baril, G; Traldi, A; Cognié, Y; Leboeuf, B;



- Cbeckers, J. y Mermillod, P. (2001) Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*. 56: 299-305.
- Brackett, B; Bousquet, D; Boice, M; Donawick, W; Evans, J. y Dressel, M. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 23:147-158.
- Bunn, S. et al. (2006). Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. *Acta Sci Vet.* 34: 309.
- Camargo, L; Oliveira, R; Viana, J; Sá, W ; Ferrerira, A. y Ramos, A. (2004). Comparación de two vitrification protocols for crossbred *Bos taurus* x *Bos indicus* *in vitro* produced embryos. Conferencia Anual International Embryo Transfer Society IETS, Reproduction, Fertility and Development. 164.
- Carvalho, E. (2006). Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotectores. (tese apresentada junto ao programa de pós-graduação em medicina veterinária para obtenção do título de doutora). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. 121.
- Celestinos, M y Gatica, R. (2002). Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. En: *Arch. Med. Vet. Valdivia.* 34 (2): 13.
- Chen, S. et al. (2001). Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod.* 16: 2350-2356.
- Chen, S. y Tian, Y. (2005). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology.* 63: 1207-1219.
- Cho, S. et al. (2002). Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci.* 73: 151-158.
- Cremades, N. et al. (2004). Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod.* 19: 300-305.
- Cutaia, I. y Bó, G. (2007). Cattle embryo production and trade in Argentina. *Acta Sci Vet.* 35(3): 931-944.
- Desai, N; Lawson J. y Goldfarb, J. (2000). Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Hum Reprod;* 15: 410-418.
- Dinnyes, A; Carolan, C.; Lonergan, P.; Solti, L.; Massip, A. y Mermillod, P. (1995). *In vitro* survival of *in vitro* produced bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology.* 43: 197.
- Dinnyés, A; Dai, S; Siang, S. y Yang, S. (2000). Somatic cell nuclear transfer with vitrified recipient oocytes in cattle. *Theriogenology.* 53: 215.
- Dinnyes, A. y Nedambale, T. (2009). Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reprod, Fert and Dev.* 21: 45-59.
- Dobrinsky, J. (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology.* 45: 17-26 .
- Dobrinsky, J; Pursel, V; Long, C. y Johnson, L. (2000). Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod.* 62: 564-570.
- Eroglu, A; Lawitts, J; Toner, M. y Toth, T. (2003).

Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*. 46:121-34.

Fahy, gm; macfarlane, d; angell, ca; meryman, ht. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 1984; 21(4): 407-426.

Guignot, F. (2005). Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA Prod Anim*. 18 (1): 27-35.

Hamawaki, A; Kuwayama, M. y Hamano, S. (1999). Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology* 51:165.

Hasler, J; Hurtgen, P; Jin, Z. y Stokes, J. (1997). Survival of IVF derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*. 46: 563-579.

He, X; Park, E; Fowler, A; Yarmush, M. y Toner, M. (2008). Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology* 56: 223-232.

Hochi, S.; Akiyama, M.; Minagawa, G.; Kimura, K. y Hanada, A. (2001). Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Cryobiology*. 41: 69-73.

Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the Cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46: 205-29.

Isachenko, V; Alabart, J; Dattena, M; Nawroth, F. y Cappai, P. (2003). New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*. 59 (5-6), March: 1209-1218.

Ishimori, H; Takahashi, Y. y Kanagawa, H.

(1992). Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology*. 37: 481-487.

Kaidi, S. et al. (2001). Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction*. 65: 1127-1134.

Kasai, M. (2002). Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. *Reproductive Medicine and Biology*. 1: 1-9.

Kasai, M. y Mukaida, T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed online*. 9: 164-170.

Kong, I. et al. (2000). Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*. 53:1817-1826.

Kuwayama, M; Hamano, S. y Nagai, T. (1992). Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal reprod fertil*. 96: 187-193.

Lane, M; Bavister, B; Lyons, E. y Forest, K. (1999). Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol*. 17: 1234-1236.

Laowtammathron, C; Lorthongpanich, C; Ketudat-cairns, M; Hochi, S. y Parnpai, R. (2005). Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. 64:1185-1196

Lazar, L; Spak, J. y David, V. (2000). The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*.



54:571-578.

Leibo, S. y Loskutoff, N. (1993). Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*. 39:81- 94.

Liebermann, J; Nawroth, F; Isachenko, V; Isachenko, E; Rahimi, G. y Tucker, M. (2002). Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod*. 67: 1671-1680.

Liebermann, J. et al. (2003). Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online*. 7: 623-633.

Laowtammathron, C; Lorthongpanich, C; Ketudat, M; Hochi, S. y Parnpai, R. (2005). Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. 64: 1185-1196.

Mahmoudzadeh, A; Van Soom, A; Ysebaert, M. y De Kruif, A. (1994). Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro-produced cattle embryos. *Theriogenology*. 42:1389-1397.

Martino, A.; Songsasen, N. y Leibo, S. (1996). Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. En: *Biol. Reprod*. 54, pp. 1059-1069.

Massip, A.; Mermillod, P. y Dinnyes, A. (1995). Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction*. 10: 3004-3011.

Massip, A. (2001). Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reprod Dom Anim*. 36: 49-55.

Mavrides, A. y Morroll, D. (2002). Cryopreservation of bovine oocytes: Is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? En: *Reprod. Nutr. Dev*. 42: 73-80.

Mezzalira, A. et al. (1999). Vitrificação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. *Acta Sci Vet* 27: 262.

Mezzalira, A; Mezzalira, J. y Moraes, A. (2004). Vitrification of bovine embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. *Arch Vet. Sci*. 9:107-111.

Molina, I.; Cervera, R.; Duque, C.; Alfonso, J. y Romeu, A. (2004). Criopreservación de ovocitos humanos. Vitrificación vs. Congelación. *Rev Iber Fert*. 21(3) Mayo-Junio.

Mucci, N; Aller, J; Kaiser, G; Hozbor, F; Cabodevila, J. y Alberio, R. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65:1551-1562.

Nedambale, T; Du, F; Yang, X. y Tian, X. (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Anim Reprod Sci*. 93: 61-75.

Niemann, H. y Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*. 53: 21-34.

O'kearney-flynn, M; Wade, M; Dufy, P; Gath, V; Boland, M. y Dobrinsky, J. (1998). Effect of cryopreservation on IVP cattle development in vitro and in vivo. *Theriogenology*. 49: 173.

Otoi, T.; Yamamoto, K.; Koyama, N.; Tachikawa, S. y Suzuki, T. (1998). Cryopreservation of

mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology*. 37: 77-85.

Palasz, A. y Mapletof, R. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*. 14: 127-149.

Pereira, R. y Marques, C. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*. 9:267-77.

Picton, H.; Gosden, R. y Leibo, S. (2002). Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. Gamete source, manipulation and disposition.

Rall, W. y Fahy, G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313: 573-575.

Rall, W. y Fahy, G. (1985). Vitrification: a new approach to embryo cryopreservation. *Theriogenology*. 23: 320.

Rizos, D.; Fair, T.; Papadopoulos, S; Boland, M. y Lonergan, P. (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod*. 62: 320-32.

Rizos, A; Gutierrez, A; Perez, S; De La Fuente, J; Boland, M. y Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*. 68:236-243.

Rodriguez, P. (2009). Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC.

Rodríguez, P; Lozano D. y Bó, G. (2011). Evaluación in vitro de la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro e in vivo criopreservados

por los métodos de congelamiento convencional o vitrificación. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC.

Saha, S. y Suzuki, T. (1997). Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three-step addition of cryoprotective additives. *Reprod. Fertil. Dev*. 9: 741-746.

Santos, R. et al. (2006). Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciencia Rural*. 36: 1501-1506.

Shaw, J. y Jones, G. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *En: Hum Reprod Upd*. 9 (6): 583-605.

Seidel, G. (1986). Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. Short course proceedings. Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University.

Seidel, G. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 65: 228-235.

Silva, M. y Berland, A. (2004). Vitrificación de blastocistos bovinos producidos in vitro con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte. *Arch. Med. Vet*. 36 (1).

Sommerfeld, V. y Niemann, H. (1999). Cryopreservation of Bovine in Vitro Produced Embryos Using Ethylene Glycol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology*. 38: 95-105.

Son, W; Yoon, S; Yoon, H; Lee, S. y Lim, J. (2003). Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids



after induced collapse of the blastocoele. Hum Reprod. 18: 137-139.

Tan, J. (2004). Vitrification of Human Oocytes and Bovine Oocytes and Embryos. Selwyn House School. Quebec, Canada.

Thibier, M. (2001). The animal embryo transfer industry in figures. Embryo Transfer Newsletter. 19:16-22

Thibier, M. (2007). The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Embryo Transfer Newsletter. 25: 4-9.

Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals (Abstract). Anim Reprod Sci. 60-61: 357-364.

Vajta, G. (2000). Oocyte and embryo vitrification. Reprod. Domest Anim. Suppl 45-48.

Vajta G. y Kuwayama, M. (2006). Improving Cryopreservation systems. Theriogenology. 65: 236-24.

Vajta, G. y Nagy, Z. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. Reproductive BioMedicine Online. 12: 779-796.

Vanderzwalmen, P. et al. (2000). "In vitro" survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. Fertility and Sterility. 74: 215-216

Vanderzwalmen, P. et al. (2002). Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. Human Reproduction. 17:744-751.

Viana, J. y Camargo, L. (2007). Bovine embryo production in Brazil: A new scenario. Acta Sci Vet. 35 (3): 915-924

Vieira, A; Forell, F; Feltrin, C. y Rodrigues, J. (2008). Calves born after direct transfer of vitrified bovine in vitro produced blastocysts derived from vitrified immature oocytes. Reprod Dom Anim. 43: 314-318.

Volkel, S. y Hu, Y. (1992). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology. 37:23-37.

Zeron, Y; Pearl, M; Borochoy, A. y Arav, A. (1999). Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. Cryobiology. 38: 35-42.