

Capítulo LXI

Criopreservación de embriones bovinos por vitrificación

Freddy Escalona Ramírez, MV
Andrés A. Kowalski Sarralde, PhD

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el crecimiento de la población mundial y el cambio en los hábitos de consumo en algunas poblaciones, ha generado un incremento en la demanda de alimentos, lo cual permite visualizar una crisis mundial, en el suministro de alimentos, sin duda alguna que el sector lácteo no escapa de esta realidad, y que el incremento de nuevas fincas lecheras no, es suficiente para satisfacer la demanda actual. Analistas internacionales aseguran que el incremento internacional de la demanda no puede ser satisfecha por metodologías tradicionales, es indispensable el uso de nuevas tecnologías especialmente en el área reproductiva, debido a esto es necesario incorporar y desarrollar en nuestras ganaderías técnicas en reproducción asistida (ART), con la finalidad de ser cada día mas eficientes en nuestros sistemas productivos.

El uso de ART representa una invaluable herramienta para la ganadería venezolana al permitir la incorporación de genes al pool ya existentes, recuperar razas criollas, conservar germoplasma de animales elite, entre otras. Entre estas técnicas encontramos Inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (TE), Fecundación *in vitro* (FIV) Inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI), transferencia nuclear (NT) y criopreservación de semen, ovocitos y embriones (Comizzoli, *et al.*, 2000).

La criopreservación de células y el almacenamiento a bajas temperaturas se ha desarrollado tanto por razones biológicas como por razones comerciales, en particular la preservación de embriones. Así lo reporta la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) donde el 50% de 500.000 embriones de bovino transferidos en los últimos años han sido criopreservados, además de que permite utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar animales de alto valor genético a bajo costo, transferir parte de los embriones y almacenar el resto hasta poder evaluar los registros, disminuir los riesgos sanitario al importar embriones y no animales en pie y

crear bancos de embriones de razas de alto valor genético, son algunas de las posibilidades, entre otros (Thiber, 1997).

En la actualidad es posible criopreservar embriones de algunos mamíferos mediante protocolos de congelación lenta, congelación rápida y vitrificación aun cuando estos presentan una alta sensibilidad a daños por enfriamiento. Por esta razón se ha tomado gran importancia en el desarrollo de nuevos procedimientos para la criopreservación de embriones y con la incorporación en 1985 la vitrificación de embriones por Rall y Fahy, se abre una ventana en la criobiología (Leibo *et al.*, 1996; Vajta, 2000; Dattena y col., 2004). Numerosas investigaciones han demostrando los beneficios prácticos y económicos de la vitrificación, pero hace falta la estandarización de protocolos para utilizar masivamente esta tecnica (Celestinos y Gatica, 2002).

PRINCIPIOS DE CRIOPRESERVACIÓN

En criopreservación, las células son suspendidas en una solución, enfriada, almacenada en nitrógeno líquido (-196°C), calentada hasta temperatura ambiente y retornada a su estado fisiológico. Esto representa un gran estrés (estrés mecánico, térmico y/o químico) para la célula y puede causar graves daños, comprometiendo su viabilidad. Entre los principales daños tenemos: el causado por la formación intracelular de hielo durante el enfriamiento y el calentamiento, la toxicidad química por los agentes crioprotectores y shock osmótico durante la incorporación y el retiro de la solución crioprotectora, además el mayor desafío para las células es pasar dos veces por la zona intermedia de temperatura que oscila entre $+15$ y -5°C . (Vajta *et al.*, 1998; Vajta, 2000; Kasai y Mukaida, 2004; Cabrera *et al.*, 2006).

Diferencias entre vitrificación y congelación lenta

La principal diferencia radica en si existe (congelación lenta) o no (vitrificación) formación de hielo en la solución durante el proceso de enfriamiento (Vajta, 2000). Los cambios celulares más notorios entre vitrificación y congelación lenta están ilustrados en la Figura 1.

La vitrificación se define como la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo, ya que atraviesa el rango de temperatura crítica ($+15$ a -5°C) a una velocidad de enfriamiento rápida, por lo que representa una razonable y eficiente estrategia para prevenir una de las causas de daño celular como lo es la formación de hielo intracelular (Dobronski, 1996; Kasai y Mukaida, 2004), además no requiere de equipos de congelación costosos.

La vitrificación presenta ventajas en relación a la congelación lenta, ya que es menor la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, disminuye los daños por criopreservación, produciendo menor daño en las gotas de lípidos intracelular (Cuadro 1), de la membrana plasmática y del citoesqueleto, desventajas como el uso de crioprotectores a concentraciones tóxicas para la células (Vajta, 2000).

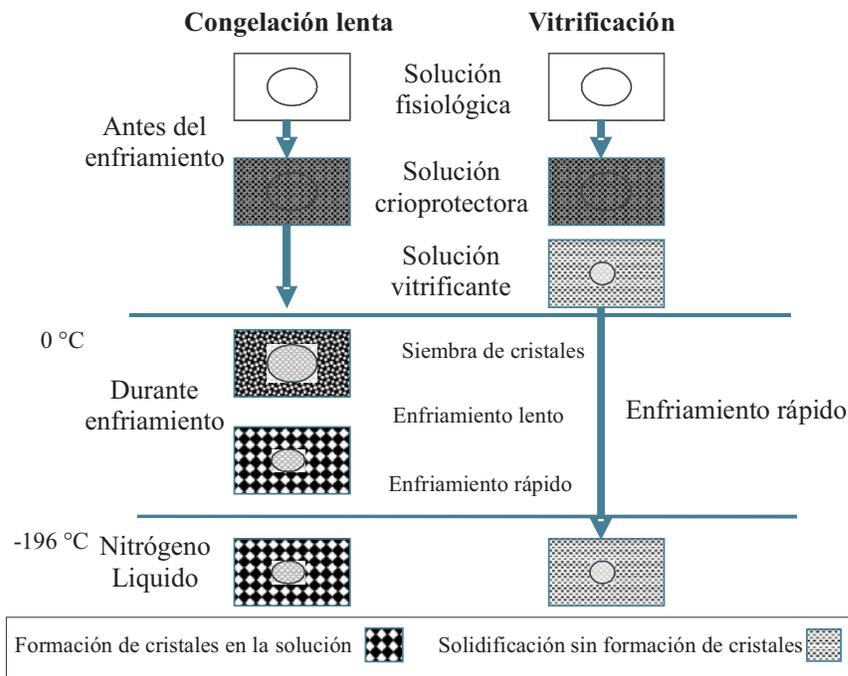


Figura 1. Cambios celulares más notorios entre vitrificación y congelación
Modificado de Kasai y Mukaida, 2004.

Cuadro 1
Diferencias entre el proceso congelación lenta y vitrificación

Diferencia	Congelación lenta	Vitrificación
Tasa de enfriamiento	0.2 a 0,3°C/minuto	> 2500°C/minuto
Concentración de crioprotectores	1 a 2 M	5 a 7 M
Daños por enfriamiento	++++	+
Shock osmótica	+	+++
Toxicidad	+	++++
Costos	++++	+

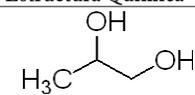
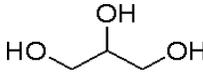
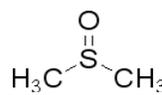
Fuente: Vajta, 2000; Kasai y Mukaida, 2004.

COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN VITRIFICANTE

Soluciones buffer: La solución de criopreservación es acuosa usualmente es preparada en fosfato bufferado salino (PBS), Heps-bufferado y medios de cultivo de tejidos (TCM)(Vajta *et al.*, 1999; Liebermann *et al.*, 2002).

Crioprotectores permeables: Los crioprotectores permeables a las células son pequeñas moléculas capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva, son el componente esencial en la solución vitrificante al desplazar el agua con-

Cuadro 2
Principales crioprotectores

Nombre	Peso molecular	Fórmula Química	Estructura Química
Propilenglicol	76.09	CH ₃ CH(OH)CH ₂ OH	
Etilenglicol	62.07	HOCH ₂ CH ₂ OH	
Glicerol	92.09	HOCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	
Dimetilsulfóxido	78.13	(CH ₃) ₂ SO	

Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail>.

tenida en su interior para disminuir la formación de cristales de hielo, entre estos se encuentran propilenglicol, etilenglicol, glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO) (Jain y Paulson. 2006; Kasai y Mukaida. 2004) (Cuadro 2).

Crioprotectores no permeables: Están conformados por pequeños sacáridos que son suplementarios en la solución vitrificante y se utilizan para incrementar la osmolaridad de la solución, facilitando de esta forma la salida de agua del interior de la célula, entre estos se encuentra azúcares como sucrosa, galactosa, glucosa, trehalosa entre otros, siendo sucrosa la más comúnmente usada en las soluciones vitrificantes.

Macromoléculas: Estas no son permeables a células y su función es reducir el efecto tóxico de los crioprotectores al disminuir su concentración en la solución vitrificante, entre estos se encuentran polyvinylpyrrolidona, albúmina sérica y ficoll-70 (Kasai y Mukaida. 2004).

Soportes para vitrificación: Para que la velocidad de enfriamiento sea lo suficientemente rápida para evitar la formación de cristales de hielo, se requiere que el volumen a vitrificar sea lo más pequeño posible para favorecer el intercambio térmico entre la muestra y el nitrógeno líquido, basándose en esta teoría se han utilizado variedad de soportes. Entre estos tenemos pajuelas de 0.25 mL (Chen *et al.*, 2001) pajuelas abiertas estiradas (OPS) (Vajta *et al.*, 1998) pajuelas cerradas estiradas (CPS) (Chen *et al.*, 2001) Gradillas de microscopía electrónica (Martino *et al.*, 1996a) cryoloop (Mavrides y Morral, 2002) micro gotas (Begin *et al.*, 2003) alcanzando una velocidad de enfriamiento que va desde 11000 a 20000°C/minuto.

Vitrificación de embriones: Luego del primer reporte de vitrificación de embriones de ratón por Rall y Fahy en 1985, se han realizado diversas investigaciones con la finalidad de estandarizar esta técnica en diferentes especies de mamíferos (Cuadro 3).

Cuadro 3
Vitrificación de ovocitos o embriones

Mamífero	Ovocito/embrión	Año	Autor
Ratón	Embrión	1985	Rall y Fahy
Bovino	Ovocito	1996b	Martino <i>et al.</i>
Bovino	Embrión	1997	Vajta <i>et al.</i>
Humano	Ovocito	1999	Kuleshova <i>et al.</i>
Rata	Embrión	1988	Kono <i>et al.</i>
Conejo	Embrión	2003	Silvestre <i>et al.</i>
Cerdo	Embrión	2000	Dobrinsky <i>et al.</i>
Oveja	Embrión	1997	Naitana <i>et al.</i>
Cabra	Embrión	2001	El-Gayar y Holtz.
Llama	Embrión	2002	Aller <i>et al.</i>
Caballo	Embrión	2001	Oberstein <i>et al.</i>

El tiempo de almacenamiento del embrión congelado es aún incierto, y varía dependiendo de las condiciones de almacenamiento. Uno de los principales daños causados en las células congeladas es la formación de hielo en su interior, provocando muerte celular (apoptosis) posterior a la descongelación, además, el grado de apoptosis incrementa en relación con los años de almacenamiento del embrión (Marquez *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

La creciente demanda de animales de alto valor genético para las unidades de producción, estimula la incorporación de ART como fecundación *in vitro*, semen sexado, ICSI, NT, entre otras. Todas estas tecnologías, aunque han demostrado tener buenos resultados cuando son usados embriones en fresco, su capacidad de difusión a todo el territorio nacional es limitada. La probabilidad de poder criopreservar este germoplasma sin generar mayores perjuicios desde el punto de vista de viabilidad para ello, se requiere del desarrollo de investigaciones con la finalidad de estandarizar protocolos de criopreservación de embriones, esto permitirá el desarrollo de programas a gran escala con material de alto valor genético, crear y mantener bancos de germoplasma que nos permitan almacenar genes de alto valor comercial y de conservación de especies. Es por ello que hoy en día una gran cantidad de laboratorios a nivel mundial y especialmente el Laboratorio de Embriología y Endocrinología Molecular de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado invierten recurso humano y financiero para perfeccionar y estandarizar procesos de criopreservación.

LITERATURA CITADA

- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. 2002. Successful transfer of vitrified llama (Lama glama) embryos. *Anim Reprod Sci* 73: 121-127.
- Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer C. 2003. cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4 cell embryos using the crioloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59(8): 1839-1850.

- Cabrera P, Fernández A, Bastidas P, Molina M, Bethencourt A, Díaz T. 2006. Vitrificación: Una Alternativa para la Criopreservación de Embriones. *Rev Fac Cienc Vet* 47 (1):9-23.
- Celestinos M, Gatica R. 2002. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch med vet* 34 (2):157-165.
- Chen S, Lien Y, Cheng Y, Chen H, Ho H, Yang Y. 2001. Vitrification of mouse oocytes using cloused pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with convencional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human reproduction* 16 (11): 2350-2356.
- Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev* 40: 493-504.
- Dattena M, Accardo, C, Pilichi S, Isachenko V, Mara L, Chessa B, Cappai P. 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology* 62(3-4):481-93.
- Dobrinsky J. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45 (1):17-26.
- El-Gayar M, Holtz W. 2001. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pullet-straw method. *J Anim Sci* 79: 2436-2438.
- Jain J, Paulson R. 2006. Oocyte cryopreservation. *Fert & Ster* 86 (Suppl 3)
- Kasai M, Mukaida T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online*. 9 (2):4-170.
- Kono T, Suzuki O, Tsunoda Y. 1988. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 25: 170-173.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson, A. 1999. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum Reprod* 14: 3077-3079.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim Reprod Sci* 42: 45-53.
- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker M.J. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 67: 1671-1680.
- Marquez-Alvarado Y, Galina C, Castilla B, León H, Moreno-Mendoza N. 2004 Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the TUNEL technique. *Reprod Dom Anim* 39:141- 45.
- Martino A, Songsasen N, Leibo S. 1996a. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54(5):1059-1069.
- Martino A, Pollard JW, Leibo SP. 1996b. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol Reprod Dev* 45: 503-512.
- Mavrides A, Morroll, D. 2002. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? *Reprod Nutr Dev* 42(1):73-80.
- Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, Cappai P. 1997. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim Reprod Sci* 48: 247-256.
- Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE, Carnevale EM, Squires EL. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 55: 607-613.
- Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.

Silvestre MA, Saeed AM, Escriba MJ, Garcii-Ximenez F. 2003. Vitrification of in vitro cultured rabbit morulae. *Anim Reprod Sci* 76: 113-124.

Thiber M. 1997. The Internacional Embryo Transfer Society. Word Statics of Embryo Transfer: The 1996 Report. *Embryo Transfer Newslett* 15: 10-13.

Vajta G, Lewis IM, Kuwayama M.; Greve T, Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51: 53-58.

Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H. 1999. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 52: 939-948.

Vatja G. 2000. vitrification of the oocytes and embryos of domestic animal. *Anim Reprod Sci* 60-61: 375-364. www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail.