XX

CRIOPRESERVACIÓN EMBRIONARIA EN EQUIDOS

Carlos C. Pérez Marín[1]
Juan J. Galisteo Martínez[2]
Estrella Agüera Buendía[1]
Guillermo Vizuete Calero[1]

[1]*Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España*
[2] *Yeguada Las Turquillas (Ecija), Cría Caballar de las FAS, España*

Presiden el Presidente de la Caja Rural Iltmo. Sr. D. José Luis García Palacios y el Excmo. Sr. Prof. Dr. D. Benito Mateos-nevado Artero, Presidente de la Real Academia

Tal y como indica la FAO, numerosas razas animales desaparecen en el mundo anualmente y es la sociedad la que debe contraer la responsabilidad de conservar el patrimonio genético que representa el conjunto de las razas de animales domésticos rústicos de cada zona. Para ello, en la actualidad contamos con la posibilidad de crear criobancos de material genético, destinados fundamentalmente en la conservación de espermatozoides, oocitos y embriones, y que pueden ofrecer importantes ventajas:

1.- Se asegura la existencia de diversidad genética dentro de las especies, las cuales están sometidas a menudo a hábitats fragmentados, depresión por consanguinidad, catástrofes medioambientales inesperadas o epidemias.

2.- Se mantiene un importante recurso genético, cuyos usos en biología de la conservación permitirá realizar estudios filogenéticos, sistemáticos y sobre enfermedades.

3.- Ventajas económicas derivan de la posibilidad de mejorar la calidad de vida de los animales, sobre todo en países en desarrollo. En este sentido, determinadas especies pueden contener genes que confieran una adaptación especial para la capacidad reproductiva o supervivencia en determinado nicho ambiental. Por ejemplo, existen genotipos que hacen a los individuos más resistentes a parásitos o determinadas enfermedades, por lo que su incorporación en ganaderías locales pueden generar animales más productivos y resistentes.

4.- Se facilita la movilidad del material genético. Cada vez más existe fragmentación de los hábitats poblados por los animales, y la conservación de gametos y embriones constituye una herramienta segura para reducir la consanguinidad y para mantener poblaciones, aun estando en la otra parte del mundo, sin tener que desplazar a los animales.

5.- Incrementa la eficacia de la reproducción en cautividad: en ocasiones los animales no permiten o aceptan aparearse dentro de una población, lo que constituye un grave problema en el caso de que dicha población tenga un reducido número de ejemplares. Aquí, las técnicas de reproducción asistida y la utilización de gametos o embriones conservados van a permitir una gestión más eficaz de la reproducción en animales en peligro de extinción o simplemente, poblaciones pequeñas.

6.- Reduce los problemas genéticos: un criobanco de gametos o embriones puede prolongar el intervalo generacional de los donantes de forma indefinida. Hoy en día, un banco de este tipo puede mantenerse indefinidamente, lo que nos permitiría en un futuro reintroducir genes originarios para desacelerar así la pérdida natural de diversidad como resultado de la deriva genética.

7.- Reduce los problemas de espacio, muy importante actualmente sobre todo en animales de zoológico, donde no es posible mantener suficientes animales machos y hembras que nos permitan asegurar una reposición adecuada. Estos criobancos de gametos y/o embriones son una alternativa interesante a tal problema.

La conservación de material genético de la hembra se lleva a cabo mediante la conservación de oocitos y embriones, lo que se ha denominado germoplasma (término que también engloba a los espermatozoides). Dicho material genético también puede ser protegido y conservado mediante la preservación de tejido ovárico o del ovario completo para su posterior transplante, seguido por recogida de oocitos o fertilización natural. La obtención de los gametos femeninos puede realizarse por diversos métodos como 1) después de la ovulación (natural o químicamente inducida), 2) mediante *ovum pick up* (OPU), realizada transvaginalmente en ciclos naturales o inducidos, 3) tras ovariectomía en casos de muerte, 4) después de la fecundación en diferentes estados de desarrollo antes de la implantación. Los oocitos recogidos pueden encontrarse en diferente nivel de maduración, lo que requiere diferente manejo por su sensibilidad.

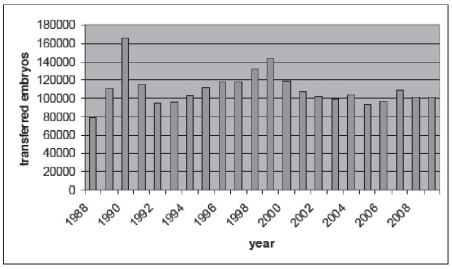
CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES EQUINOS

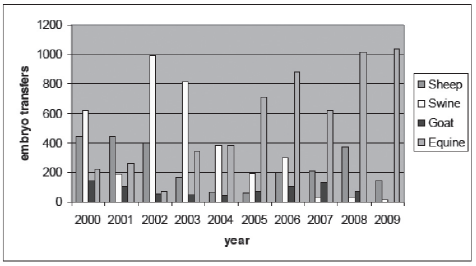
En la especie equina, cuando nos planteamos la criopreservación embrionaria tenemos que conocer perfectamente todos los aspectos relacionados con la transferencia de embriones (TE). La transferencia de embriones es una técnica de reproducción asistida de tremenda importancia en

las grandes especies animales, aunque no alcanza el éxito y difusión suficiente en yeguas por muy distintos motivos. Desde 1974, cuando Oguri y Tsutsumi realizaron la primera transferencia exitosa de embriones, se ha avanzado lentamente en el desarrollo de la técnica, unas veces por la falta de respuesta de la yegua a los tratamientos existentes (principalmente en lo que a superovulación se refiere) y otras veces por motivos comerciales o logísticos; nos referimos a la negativa de numerosas asociaciones equinas a permitir el registro de más de un parto por estación y yegua, lo que ha llevado a frenar en parte el desarrollo comercial y práctico de esta tecnología. Ahora se abre un mar de posibilidades gracias a la permisividad de las asociaciones (sobre todo la de Quarter Americano en América), que ha impulsado enormemente esta industria. En la última década, EEUU ha estado a la cabeza en la TE, destacando también países como Brasil y Argentina, seguidos de Australia, Canadá, Italia, Alemania y Francia.

En este momento, y a partir de los informes generados por la Asociación Europea de Transferencia Embrionaria (AETE), puede verse cómo se ha producido un incremento y estabilización de dicha actividad en Europa, destacando la actividad de los equipos italianos que transfieren embriones producidos in vitro mediante inyección intracitoplamástica de espermatozoides (ICSI). Concretamente fueron registrados un total de 60 transferencias durante 2009.

Estas cifras quedan lejos de lo que ocurre en vacuno, como puede verse en los gráficos siguientes:





Número total de embriones bovinos (gráfico izquierdo) y de otras especies (gráfico derecho) transferidos en Europa (datos publicados por la AETE 2011).

El deseo de los ganaderos de producir muchos potros procedentes de una misma madre durante un mismo año, junto al consentimiento de las asociaciones para inscribir a estos animales, ha permitido que técnicas

como la transferencia de embriones haya sido desarrollada de forma comercial. Países como EEUU, Argentina o Brasil realizan recogida de embriones con gran frecuencia, los cuales son transferidos en fresco o conservados para su posterior utilización. En Europa, la expansión de la TE ha estado frenada por las restricciones impuestas por diferentes asociaciones equinas para la inscripción de los potros nacidos con esta técnica reproductiva, además de por los elevados costes derivados del mantenimiento de hembras receptoras. Esto último puede verse reducido gracias al desarrollo de técnicas de conservación embrionaria. Históricamente fue en 1982 cuando se describió el nacimiento del 1er potro a partir de embriones congelados y refrigerados en Japón (Yamamoto y col, 1982), alcanzándose el carácter comercial de dicha técnica hacia 1987. Asimismo, en 1994 nace el primer potro a partir de vitrificación (Hochi y col, 1994), una nueva técnica para conservar indefinidamente embriones. Sin embargo, las muchas dificultades técnicas asociadas a la transferencia de embriones se ven complicadas por los procesos de criopreservación, lo cual ha reducido su expansión. Entre ellas destaca que la mayoría de las yeguas en un programa de transferencia embrionaria presentan ovulaciones simples; esto hace que la recogida embrionaria sea de un 50% por ciclo estral y la tasa de gestación por transferencia embrionaria resulta de un 75%. Por tanto, la probabilidad de obtener una gestación a partir de transferencia embrionaria con ovulaciones simples es de un 35 %.

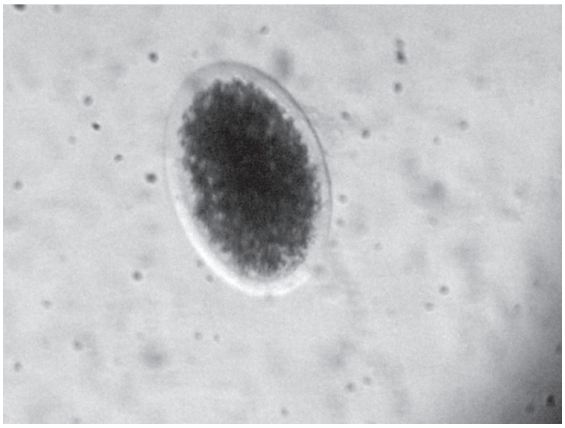
Cuando analizamos las dificultades de la TE y, por ende, de la conservación embrionaria, debemos destacar la morfología y fisiología ovárica de la yegua. Por un lado, su ***carácter estacional*** reduce la posibilidad de obtener embriones durante una parte del año, haciendo menos productiva dicha técnica frente a otras especies. Desde el punto de vista anatómico destaca la ***fosa de ovulación***, estructura que se encarga de captar los oocitos liberados desde el folículo dominante (FD). Es necesario que dichos FDs confluyan y desemboquen en la fosa. En caso contrario, a pesar de conseguir una buena respuesta superovulatoria, los oocitos nunca alcanzarán la fosa de ovulación, reduciendo la potencial tasa de recogida embrionaria.

No sólo la estructura y fisiología ovárica dificultad la obtención embrionaria. ***La mala respuesta a los tratamientos de superovulación*** también ha sido determinante en su progresión. El tejido gonadal equino presenta una baja concentración de receptores de eCG, por lo que la respuesta a esta hormona es muy limitada. Entre los beneficios potenciales

de la superovulación se encuentran el incremento de la tasa de recogida embrionaria o de oocitos, la disponibilidad de embriones para congelación o vitrificación, mejora de la fertilidad en yeguas subfértiles y la aceleración de la primera ovulación. El tratamiento de superovulación más empleado y que mejores resultado ha dado es el basado en la **hormona foliculoestimulante equina (FSHe)**. Sin embargo, a pesar de que los resultados publicados eran aceptables, hoy en día esta hormona ha dejado de comercializarse debido al cierre de mataderos de caballos en EEUU, país en el que se estaban desarrollando estos protocolos.

BASES PARA LA CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

Según nuestras necesidades, podemos optar por la **refrigeración**, **congelación lenta** o **vitrificación** de embriones y, en cada caso, las condiciones de obtención embrionaria pueden variar. En general, los embriones son recogidos a partir del día 6 (contados a partir de la ovulación). En ese momento, los embriones equinos llegan al útero, lugar donde pueden ser recogidos mediante técnica no cruentas, concretamente mediante lavado uterino o *flushing*. Los embriones pueden ser recogidos y transferidos entre los 5.5 y 8.0 días de edad. A partir de entonces, éstos se hacen mucho más sensibles a factores externos.

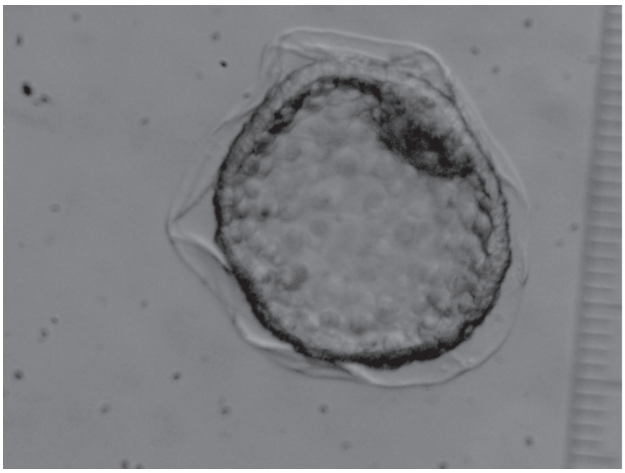


Mórula de 6.0 días. Presenta una morfología ovalada, apreciándose claramente la zona pelúcida que la rodea.

En el caso de la refrigeración de embriones, suele hacerse para enviarlos a otro lugar, no debiendo pasar más de 24 h. desde la recogida, o para

transferirlos a yeguas que no estaban correctamente sincronizadas en el momento de la recogida. Se utilizan medios complejos, como es el caso del medio Ham F-10 que necesitaba ser gaseado con 5% de CO_2, 5% de O_2 y 90% de N_2, aunque luego fueron modificados con soluciones tampón como HEPES. En la actualidad existe medios comerciales como Syngro, Vygro ó EmCare, entre otros, que permitan refrigerar el embrión a 5ºC. Medios de lavado zwitertónicos, como el Euroflush (IMV) también han demostrado su capacidad para mantener al embrión en perfectas condiciones durante la refrigeración, si bien la necesidad de utilizar volúmenes mayores (500 ml) hacen más incomodo su uso.

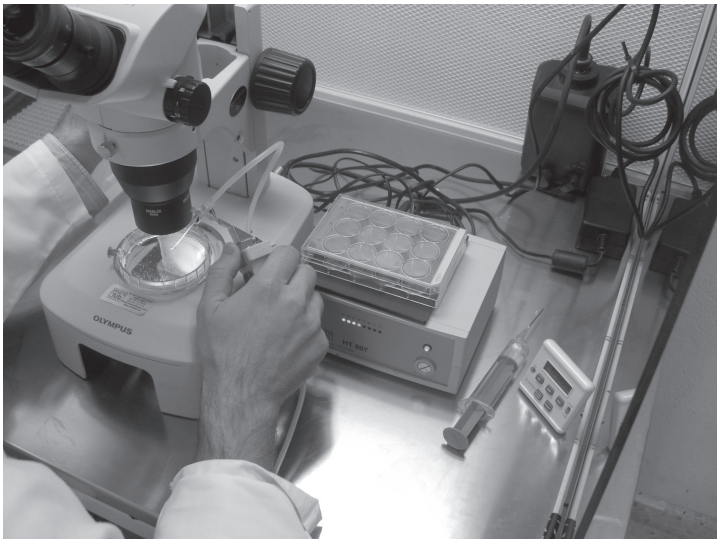
Dentro de ese margen de edad embrionaria, si queremos congelar o vitrificar los embriones, deberemos hacerlo lo antes posible, esto es, a los 6.0-6.5 días. La razón es que, a partir de esa fecha, se forma una cápsula acelular de glicoproteínas, localizada entre el trofoblasto y la zona pelúcida (ZP). Se le atribuye la capacidad de mantener la forma esférica del embrión equino después de la rotura de la ZP y también se cree que su formación reduce las posibilidades de criopreservación del embrión equino.



Embrión de 7 días, en el que puede apreciarse ausencia
de zona pelúcida y la gruesa cápsula glicoproteica rodeándolo.

Aunque se ha demostrado que permite el paso de los crioprotectores, se sospecha que interfiere su difusión, por lo que aquellos embriones de más de 300 μm presentan una reducida capacidad de criopreservación. Este tamaño traducido en edad embrionaria es de 6.5 días, por lo que la

recuperación temprana del embrión constituye un nuevo escollo para esta técnica. Sin duda, cuanto más pequeño es el embrión y más nos aproximamos al momento de su tránsito tubárico-uterino, menos posibilidades de recolección embrionaria tendremos pero más posibilidades de conservación en aquellos embriones recojamos. La masa celular del blastocisto equino es muy pequeña, a diferencia de otras especies, por lo que cualquier mínimo daño en ella durante la congelación dará lugar al fracaso de la técnica.



Lupa estereoscópica durante el proceso de búsqueda y valoración embrionaria. Se utiliza una micropipeteador para pasar el embrión al medio de mantenimiento, en el que se pasa hasta 6-10 veces para eliminar detritus celulares. Todo el trabajo se realiza bajo cámara de flujo laminar para mantener un ambiente estéril y a una temperatura de 37-38ºC.

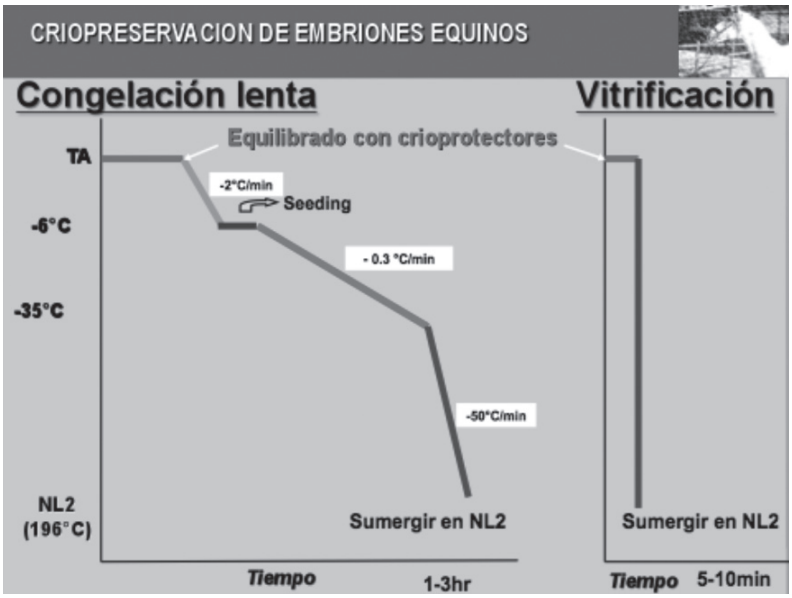
Cuando pensamos en la conservación de embriones debemos considerar qué técnicas tenemos a nuestra disposición. La primera en desarrollarse fue la ***congelación lenta*** (slow freeezing technique), en los años 70. Para ello, los oocitos o embriones son expuestos gradualmente a concentraciones relativamente bajas de crioprotectores *penetrantes*. Estos son normalmente el glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) en rangos que oscilan entre 1.0-1.5 M para oocitos y 1.35-1.5M para embriones. Existen otros crioprotectores que se utilizan solos o combinados, como es el caso del etilenglicol (EG) y el propilenglicol, así como otros de *tipo no penetrante*,

entre los que destacan la sacarosa, glucosa o fructosa. Aunque el etilenglicol es muy utilizado en otras especies como el vacuno, ya que permite la transferencia directa sin necesidad de retirar el crioprotector (CP), su empleo en congelación de embriones equinos no ha mostrado resultados tan buenos como los ofrecidos por el glicerol (Bruyas y col, 2000). Tras la exposición a los CPs, los embriones u oocitos son cargados en pequeños volúmenes dentro de pajuelas y enfriadas a -5 hasta -7ºC, donde se mantienen para su equilibrado. Después del equilibrado, la solución es sometida a *seeding*, proceso por el que se inicia la congelación extracelular y comienza el descenso lento de temperatura a aproximadamente 0.3-0.5ºC/min, llegando a -30 ó -60ºC. Cuando estamos en la temperatura deseada, las pajuelas son sumergidas en NL para su almacenamiento. El *seeding* de la solución extracelular y la congelación lenta asegura que la congelación se produzca sólo fuera del embrión u óvulo, resultando en movimiento interno de agua osmóticamente activa desde el embrión y su gradual deshidratación hasta que alcanza la temperatura a la cuál se congela la matriz intracelular.

La segunda técnica que existe es la ***vitrificación***. La estrategia seguida en la vitrificación es básicamente diferente a la congelación lenta, ya que esta última intenta mantener un balance delicado entre diversos factores tales como la formación de hielo, el daño osmótico, la alteración del citoesqueleto, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentraciones intracelulares de electrolitos, los daños causados por el frío, la fractura de la zona pelúcida, la alteración de orgánulos intracelulares y el contacto célula-célula. Por el contrario, la vitrificación puede incrementar la probabilidad de algunas formas de daño celular, pero elimina totalmente los daños mecánicos causados por la formación de cristales de hielo tanto intra como extracelular, siendo ésta la mayor causa de muerte celular. El incremento de la tasa de enfriamiento disminuye el daño al citoesqueleto y al contenido lipídico de la membrana.

La vitrificación se basa en el control de 3 factores fundamentales: la tasa de refrigeración, la viscosidad y el volumen utilizado.

-Las *tasas de refrigeración* o enfriamiento son conseguidas con NL o sus vapores. Cuando usamos NL, la muestra es incluida en él para alcanzar tasas de refrigeración de miles de grados por minuto dependiendo del contenedor, volumen, conductividad térmica, composición de la solución, etc. (Yavin y Arav, 2007). Se ha demostrado que incrementando la tasa de enfriamiento pueden mejorarse las tasas de supervivencia.

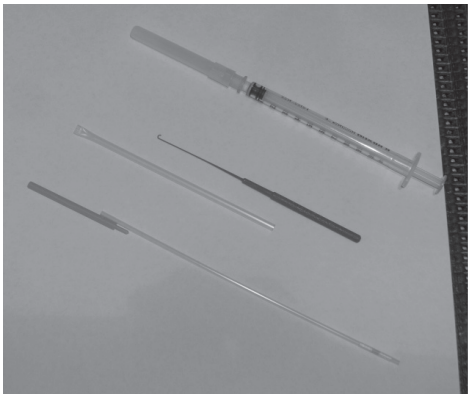


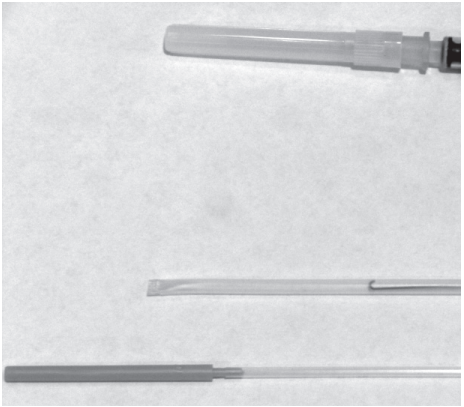
Esquema comparativo de las rampas de descenso de temperatura en la congelación lenta y la vitrificación.

-También es importante la *viscosidad del medio* en el que se sumergen los embriones. Esto vendrá definido por la concentración y comportamiento de varios CPs y otros aditivos durante la vitrificación. A más altas concentraciones de CPs, mayor temperatura de transición en el vidrio, y por tanto, disminuye la posibilidad de formación de hielo y cristalización. La toxicidad de los CPs y aditivos también es variable, como ocurre con la tasa de penetración y la temperatura de transición al vidrio. La combinación de diferentes CPs es a menudo utilizado para incrementar la viscosidad, incrementar la temperatura de transición y reducir el nivel de toxicidad.

-El *volumen* que envuelve al embrión condiciona su conservación. A menores volúmenes, mayor probabilidad de vitrificación. De esta forma se consigue una mejor transferencia de calor, obteniendo tasas de refrigeración más altas. Muchos soportes han sido desarrollados para reducir el volumen de la muestra, quedando divididos en soportes de superficie o soportes en tubos. En la primera, podemos incluir la rejilla de microscopio electrónico, gota de tamaño mínimo (MDS), cryotop, hemi-straws, superficie sólida, malla de nylon, cryoleaf, vitrificación directa, fiber plug, espátula, Cryo-E, plastic blade y Vitri-Inga (Saragusti y Arav, 2011). En-

tre las técnicas en tubos tenemos las pajuelas de plástico, pajuelas estrechas cerradas o abiertas (CPS, OPS), flexipet-denuding pippete, CryoTip, Dispositivos de alta seguridad, Pajuelas selladas, Criopette, Rapid-iTM ó pajuela JY (Saragusti y Arav, 2011). En el caso de embriones equinos, se suele utilizar con frecuencia la pajuela de 0.25 ml y la OPS, aunque existe trabajos que describen el uso del Cryoloop y, en nuestro equipo de investigación trabajamos con el soporte Fiberplug. Los nuevos soportes van encaminados a reducir el volumen que rodea al embrión. Mientras que con una pajuela convencional el volumen es de 250 μl, el soporte Fiberplug permite reducirlo hasta 2 μl, mejorando el proceso de vitrificación.





Soporte Fiberplug (color morado) y pajuela convencional de 0.25 ml (naranja), utilizados para vitrificar embriones.

En la siguiente tabla se exponen los distintos métodos de conservación de embriones, así como sus diferentes procedimientos de actuación, medios de conservación, ventajas y limitaciones:

Método	Procedimiento	Medio	Ventajas	Limitaciones
Refrigeración	↓ 0.5 °C/min hasta 5 ºC	Medio de mantenimiento (EmCare, Syngro, Vygro)	Alta viabilidad	Hasta 24 horas

Congelación convencional	↓0.5 °C/min hasta -6 °C, ↓0.3°C/min hasta -30ºC, ↓0.1°/min hasta -33° C.	Glicerol Glutamina Sucrosa	Largo periodo de conservación	Tiempo empleado Equipamiento caro
Vitrificación	Congelación a -196 ºC en Nitrógeno Líquido	Glicerol Etilenglicol Galactosa	Largo periodo de conservación Congelación rápida Menor daño Método barato	Baja viabilidad Necesita destreza en la manipulación embrionaria

DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE VITRIFICACIÓN EN EMBRIONES EQUINOS

La estrategia de la vitrificación es básicamente diferente a la congelación lenta, ya que esta última intenta mantener un balance delicado entre diversos factores tales como la formación de hielo, el daño osmótico, la alteración del citoesqueleto, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentraciones intracelulares de electrolitos, los daños causados por el frío, la fractura de la zona pelúcida, la alteración de orgánulos intracelulares y el contacto célula-célula. Por el contrario, la vitrificación puede incrementar la probabilidad de algunas formas de daño celular, pero elimina totalmente los daños mecánicos causados por la formación de cristales de hielo tanto intra como extracelular, siendo ésta la mayor causa de muerte celular. El incremento de la tasa de enfriamiento disminuye el daño al citoesqueleto y al contenido lipídico de la membrana; a su vez, permite un transcurso rápido a través del rango de temperatura de peligro que oscila entre 15 y -5ºC.

Un protocolo óptimo de vitrificación de embriones puede ser logrado gracias al reemplazo del agua intracelular por los crioprotectores penetrantes durante el equilibrado y a la mínima presencia de estos crioprotectores en el citoplasma post calentamiento. El enfriamiento es logrado al colocar los embriones en nitrógeno líquido, por lo tanto no se requieren equipos costosos de congelación a tasas controladas, constituyendo un procedimiento bastante económico.

- La **solución de vitrificación** a la cuál se exponen los embriones está formada por los siguientes componentes:
- Solución base: medios con pH estable que oscila entre 7.2 y 7.4. El medio base más empleado es el Buffer Fosfato Salino (PBS) aunque también se utilizan medios de cultivo embrionarios tales como el medio de cultivo de tejido 199 (TCM-199), el medio HEPES-buffered Ham's F10 (h-CM) y combinaciones de medios HEPES y TCM-199.
- Agentes crioprotectores: Es necesario incluir los agentes crioprotectores en la solución de vitrificación, ya que previenen el daño celular tanto en el proceso de enfriamiento como en el de calentamiento. En general, cuando los embriones son expuestos a un crioprotector, estos inicialmente se contraen por pérdida de agua, es decir, se deshidratan debido a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular, y además porque los embriones son más permeables al agua que a los crioprotectores. Para tal fin, existen tres grupos de agentes crioprotectores. Un primer grupo conformado por crioprotectores penetrantes de bajo peso molecular; entre ellos se encuentra el metanol, el etilenglicol, el propilenglicol, el dimetilsulfóxido, el 2,3 butanediol, el glicerol, y otros alcoholes. Un segundo grupo lo conforman crioprotectores no penetrantes de bajo peso molecular como la galactosa, la glucosa, la sucrosa, la trehalosa y otros azúcares. El tercer y último grupo está constituido por crioprotectores no penetrantes de alto peso molecular entre los que resaltan la polivinilpirrolidona, el alcohol polivinílico, el hialuronidato de sodio y otros polímeros.

La presencia de crioprotectores penetrantes de bajo peso molecular es absolutamente necesaria durante el proceso de criopreservación. La mayoría de éstos, son capaces de penetrar al embrión a temperatura ambiente o superiores, siendo su penetración parcial, requisito indispensable para su protección, ya que la penetración completa del crioprotector dentro de la célula puede provocar toxicidad química y daño osmótico. Para alcanzar la vitrificación a ciertas velocidades de enfriamiento, la concentración de los solutos requerida debe ser alta, por lo tanto, la toxicidad de los solutos es de gran importancia. La embriotoxicidad puede ser bioquímica (causante de desnaturalización enzimática) o por estrés osmótico, siendo afectadas ambas formas de toxicidad por la concentración de los crioprotectores y por su tasa de permeabilidad. El crioprotector etilenglicol es

más permeable al embrión que el propilenglicol y éste a su vez es más permeable que el glicerol. Este orden se relaciona inversamente con la embriotoxicidad, lo cual es una evidencia de la relación de los componentes bioquímicos con la embriotoxicidad de los crioprotectores. Una tasa aceptable de vitrificación puede ser obtenida con altas concentraciones de un solo crioprotector, pero estas concentraciones son frecuentemente tóxicas para los embriones. El desafío, entonces, es encontrar solutos o una mezcla de solutos que permita obtener una solución vitrificable y que no sea tóxica a las células. Generalmente, mezclas de crioprotectores vitrifican a concentraciones bajas, siendo así probablemente menos tóxicas, con lo cuál se combinan las propiedades vitrificantes de un crioprotector con la baja toxicidad de otro. En una serie de estudios han seleccionado la mezcla de etilenglicol y glicerol como la adecuada para la vitrificación. La sucrosa confiere un efecto protector adicional, ya que este crioprotector, no permeable, causa una deshidratación al embrión, con lo cual se reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular, concentrando macromoléculas en el citoplasma y facilitando la vitrificación intracelular. Azúcares como la dextrosa y la sucrosa previenen la penetración excesiva de otros crioprotectores al embrión, a través de una penetración ligera de estos sacáridos a la célula a la vez que ocasionan contracción celular.

A continuación mostramos las soluciones de vitrificación más empleadas en la actualidad para embriones equinos:

- Glicerol y etilenglicol en PBS (Carnevale y col., 2004; Hudson y col., 2006; Eldridge-Panuska y col., 2005; Carnevale y col., 2004):

  Solución de vitrificación 1: 1.4 M de glicerol en PBS durante 5 minutos.

  Solución de vitrificación 2: 1.4 M de glicerol y 3.6 M de etilenglicol en PBS durante 5 minutos.

  Solución de vitrificación 3: 3.4 M de glicerol y 4.6 M de etilenglicol en PBS durante 50-60 segundos.

- DMSO y etilenglicol en TCM (Mousa y col., 2004 y 2005):

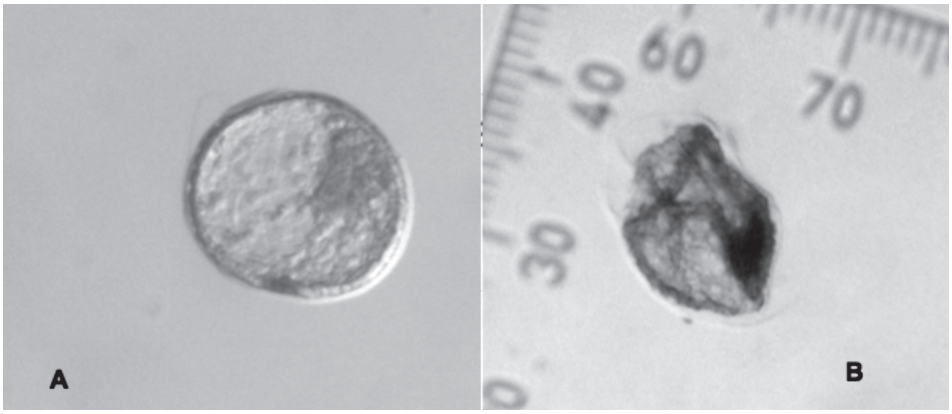
  Solución de vitrificación 1: TCM con 7,5% DMSO y 7,5% etilenglicol durante 3 minutos.

  Solución de vitrificación final: TCM con 18% DMSO, 18% etilenglicol y 0,4 M de sucrosa durante 1 minuto.

- DMSO y etilenglicol en H-SOF (Oberstein y col., 2001) :

Solución de vitrificación 1: H-SOF con 7,5% de DMSO y 7,5% de etilenglicol durante 3 minutos.

Solución de vitrificación 2: H-SOF con 16,5% de etilenglicol, 16,5% de DMSO y 0,5 M de sucrosa.



Cambio de la estructura de un embrión de 7 días (A) durante el proceso previo a la vitrificación. En la imagen B, el embrión es sometido a sustancias crioprotectoras que lo deshidratan.

Cuando se envasan los embriones en pajuelas convencionales o en OPS, éstas se colocan dentro de un recipiente de plástico (10 x 120 mm) sobre un recipiente con nitrógeno líquido, sujeta por dos fórceps de modo que no es introducida en el líquido, sino que solamente es sometida a la acción del vapor durante 1 minuto. Transcurrido este tiempo introducimos el soporte con el embrión es introducido en el nitrógeno líquido.

Otra técnica de vitrificación muy efectiva aunque aún poco empleada es el **"Fiberplug".** Consiste en un gancho de plástico sobre el que se deja una pequeña gota conteniendo el embrión, después de haber sido sometido a la acción de los CPs. La vitrificación mediante el método "fiberplug" aventaja los procedimientos convencionales de vitrificación por ser un sistema carente de capa termoaislante, aunado a un volumen muy pequeño (2μl) de solución de vitrificación, ocurriendo un intercambio de calor uniforme y rápido durante el enfriamiento.

El procedimiento de **equilibrado** constituye la exposición de los embriones a la solución de vitrificación, teniendo presente un control cuidadoso para prevenir daños debidos a toxicidad química o excesivo estrés osmótico durante el equilibrado o subsiguiente dilución. La cantidad de crioprotector en la solución de vitrificación que penetra el citoplasma

del embrión, determina de un modo u otro que ocurra daño osmótico. Aunque la penetración parcial del crioprotector resulta necesaria para una criopreservación exitosa, una completa penetración incrementa la probabilidad de daños debido a una toxicidad química o a un excesivo aumento de volumen osmótico durante la dilución. Una estrategia para controlar la penetración del crioprotector y producir el grado necesario de deshidratación citoplasmática es el uso de un procedimiento de equilibrado a manera de pasos. En tal sentido, se han desarrollado protocolos incorporando desde uno hasta cuatro pasos de equilibrado. Una segunda variable reseñada durante el período de equilibrado es su duración. La duración de exposición de los embriones a temperatura pre-vitrificación está inversamente relacionada a la tasa de enfriamiento. Una estrategia para evitar la toxicidad de la solución de vitrificación consiste en acortar el tiempo de exposición de los embriones a la solución. Sin embargo, si la exposición es demasiado corta, la penetración del crioprotector podría no ser lo suficiente, y causar formación de hielo intracelular aún existiendo ausencia de hielo extracelular. Por lo tanto, el tiempo óptimo de exposición para una vitrificación exitosa debe ser intermedio, con el fin de prevenir el daño osmótico y la formación de hielo intracelular. Una tercera variable estudiada durante el proceso de equilibrado es la temperatura a la cual se realiza, ya que la penetración y toxicidad de un crioprotector está altamente influenciada por la temperatura. Una estrategia para reducir la toxicidad es disminuir la temperatura de equilibrado, aunque se ha demostrado que la temperatura ambiente (25ºC) ha sido la más exitosa al usar mezclas de crioprotectores como etilenglicol más glicerol.

Embrión de 7.5 días durante la vitrificación. Se aprecia como pierde su forma esférica al estar en un medio hiperosmótico.

El término congelación específicamente se relaciona con la formación de cristales de hielo, mientras que bajo condiciones de vitrificación donde no existe la formación de estos cristales, el término enfriamiento es el más adecuado. El incremento de las tasas de enfriamiento durante la vitrificación mejora la supervivencia del embrión; sin embargo, cuando los embriones criopreservados son extraídos del nitrógeno líquido, ocasionalmente algunos son encontrados con fractura de zona pelúcida. La ruptura física de la zona pelúcida es causada por un estrés mecánico producido por los cambios de volumen no uniformes de la solución de vitrificación, siendo factible su ocurrencia durante cambios rápidos de temperatura. Las fracturas de la zona pelúcida ocurren cuando soluciones de altas concentraciones, son enfriadas rápidamente al sumergirlas bruscamente en nitrógeno líquido. En contraste, en una solución de similares concentraciones, raramente la zona pelúcida se fractura cuando se enfría en los vapores del nitrógeno líquido durante dos minutos, seguido de la inmersión en nitrógeno líquido. El enfriamiento en vapores de nitrógeno líquido durante la vitrificación debe ser considerado para prevenir fracturas en el embrión, lográndose una incidencia menor de daños a la zona pelúcida que en la congelación lenta. Enfriamientos ultrarrápidos no proveen el tiempo suficiente para los procesos cinéticos que son necesarios para la formación y crecimiento espontáneo de núcleos de hielo en soluciones acuosas. La tasa de enfriamiento lograda con la técnica OPS es de 22500º C/min, en comparación con 2550º C/min logrados con la pajuela de 250 μL.

Cuando queremos descongelar o, mejor dicho, calentar el embrión vitrificado, se producirá el cambio de fase sólida a líquida en la solución de crioprotectores en el rango de -110 y -135º C, momento en el que suele ocurrir la fractura de la zona pelúcida. Para prevenirla se pueden pasar los embriones moderadamente a través de esta temperatura, manteniendo la pajuela a temperatura ambiente durante unos diez segundos antes de un rápido calentamiento (inmersión en agua a 20-22º C durante otros diez segundos), logrando embriones sin daño en la zona pelúcida y con una elevada viabilidad.

Como conclusión a esta disertación decir que la transferencia embrionaria equina es una técnica de reproducción asistida que nos permite maximizar el material genético de la hembra e incrementar el progreso genético de una explotación. El transporte de embriones y el hecho de que los materiales necesarios para la recolección y transporte sean accesi-

bles permiten que esta técnica se encuentre actualmente en auge, aunque existen problemas que afrontar, como la dificultad en inducir la superovulación en la yegua, o la baja viabilidad de los embriones congelados, aunque numerosos esfuerzos investigadores están permitiendo progresar eficazmente en este campo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado dentro del proyecto RZ2008-00025, financiado por el INIA, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i)

ESTUDIO	RECOGIDA	CONSERVACIÓN	PROTOCOLO	TASA GESTACIÓN
E.M. Carnevale, W.D. Eldrige-Panuska, V. Caracciolo di Brienza. **How to collect and Vitrify Equine Embryos for Direct Transfer**. *IVIS*, 2004.	Día 6,5.	Vitrificación	- VS 1: 1.4 M de glicerol en PBS durante 5 minutos. - VS 2: 1.4 M de glicerol y 3.6 M de etilenglicol en PBS durante 5 minutos. - VS 3: 3.4 M de glicerol y 4.6 M de etilenglicol en PBS durante menos de 1 minuto.	62%
J.Hudson, P. McCue, M. Carnevale, S. Welch, E. Squires. **The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer**. *Journal of equine veterinary science*, February 2006.	Día 6,5	Grupo 1: Refrigeración (5-8º C) 12 a 19 horas + Vitrificación Grupo 2: Vitrificación tras recogida	Grupo 1: Refrigeración: 5-8 º C durante 12-19 horas. Grupo 2: Vitrificación: -VS 1: 1.4 M de glicerol en PBS durante 5 minutos -VS 2: 3,4 M de glicerol y 4,6 M de etilenglicol en PBS durante 50 a 60 segundos. -VS 3:1,4 M de glicerol y 3,6 M de etilenglicol en PBS durante 5 minutos.	Grupo 1: 65% Grupo 2: 75%
E.M. Carnevale, W.D. Eldridge-Panuska, V. Caracciolo di Brienza, G.E. Seidel, E.L. Squires. **Embryo development rates alter vitrification and transfer of equine embryos.** *Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 2004.	Día 6 a 8	Vitrificación	Grupo 1: embriones ≤ 300 μm, VS3: 3.4 M glicerol+ 4.6 M etilenglicol Grupo 2: embriones ≥ 300 μm, VS3: 3.4 M glicerol+ 4.6 M etilenglicol Grupo 3: embriones ≥ 300 μm VS3: 6,6 M etilenglicol+ 1,4 M glicerol Grupo 4: embriones ≤ 300 μm transferencia directa.	Grupo 1: 45% Grupo 4: 62%
W. D. Eldridge-Panuska, V. Caracciolo di Brienza, G.E. Seidel, E.L. Squires, E.M. Carnevale. **Establishment of pregnancies afer serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos.** *Theriogenology*, 2005.	Día 6,5 y 7,5	Vitrificación	- VS1: 1,4 M de glicerol en PBS durante 5 minutos. - VS2: 1,4 M de glicerol y 3,6 M de etilenglicol en PBS durante 5 minutos - VS3: 3,4 M de glicerol y 4,6 M de etilenglicol en PBS.	Diluciones seriadas de crioprotector: 45% Transferencia directa: 65%

N. Oberstein, M.K. Donovan, J.E. Bruemmer, G.E. Seidel, E.M. Carnevale, E.L. Squires. **Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods.** *Theriogenology,* 55:607-613, 2001	Día 6 y 7	Grupo 1: Congelación convencional Grupo 2: Vitrificación en pajuela OPS Grupo 3: "Cryoloop"	Grupo 1: Congelación convencional: medio H-SOF con 1,8 M de etilenglicol y 0,1 M de sucrosa, equilibrado a 30º C durante 10 minutos. -Cargar en pajuelas de 0,25 ml. -Congelador programable: Tª↓0,5ºC/min hasta -6ºC; seeding; Tª↓0,3ºC/min hasta -35ºC. - Sumergir pajuelas en NL. Grupo 2: Vitrificación en pajuela OPS: - VS1: medio H-SOF con 7,5% de DMSO y 7,5% de etilenglicol durante 3 minutos. - VS2: medio H-SOF con 16,5% de etilenglicol, 16,5% de DMSO y 0,5 M de sucrosa. Grupo 3: "Cryoloop": medio H-SOF con 7,5% de DMSO y 7,5% de etilenglicol durante 2.5 minutos. Tras esto, los embriones se transfieren a medio H-SOF con DMSO (17,5%), etilenglicol (17,5%), 1 M de sucrosa y 0,25 µM de ficoll.	74 51 48
M. Mousa, I. Bersinger, P.Doligez, F. Guignot, G. Duchamp, M. Vidament, P. Mermillod, J-F. Bruyas. **In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow cooling and open-pulled-straw (OPS) vitrification.** *Theriogenology* 2005.	Día 6,5 y 6,75	Grupo 1: Congelación convencional. Grupo 2: Vitrificación	Grupo 1: Congelación convencional: Medio MPBS suplementado con 100mM de glutamina, en concentraciones crecientes de glicerol (2,5%, 5%, 7%, 10%), 5 minutos en cada una. Tª: ↓ 3º C/ min hasta alcanzar -7º C y se mantienen 9 minutos.↓ 0,3º C/ min hasta alcanzar -30º C. Introducimos en NL durante 4 meses. Grupo 2: Vitrificación: - VS1: medio TCM Sigma + 20% BCS + 7,5% DMSO+ 7,5% etilenglicol durante 3 minutos. - VS2: TCM + 20% BCS + 18% DMSO + 18% etilenglicol + 0,4 M sucrosa.	Embriones viables: 90-99 Embriones degenerados: 20-58% Embriones viables: 90-99 Embriones degenerados: 0-60%

M. Mousa, I.Bersinger, P.Doligez, F.Guignot, G. Duchamp, M. Vidament, J-F. Bruyas, P. Mermillod. **Slow freezing vs open pulled straw (OPS) vitrification for equine embryo cryopreservation.** *Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 2004.	Día 6.5 y 6.75	Grupo 1: Congelación lenta Grupo 2: Vitrificación en pajuela OPS	Grupo 1: congelación lenta - Medio MPBS con 100 mM de glutamina y glicerol (2.5, 5, 7.5 y 10% durante 5 minutos a temperatura ambiente). - Cargar en pajuelas de 0,25 ml - Congelador programable: Tª ↓ 3ºC/min hasta -7ºC, Seeding, -7ºC durante 9 minutos, ↓tª 0,3ºC/min hasta -30ºC, introducir en NL. Grupo 2: vitrificación -TCM 199 Hepes + 20% de suero fetal bovino durante 2x1 minutos. -TCM + 7,5% DMSO+ 7,5% etilenglicol durante 3 minutos. - TCM + 18% DMSO+ 18% etilenglicol + 0,4 M de sucrosa durante 1 minuto.	58 54
P.N. Castanheira, D.C.G Amaral, A.B. Vasconcelos, R.M.E. Arantes, R.Stahlberg, M.A. Lagares. **Cryopreservation of equine embryos by vitrification**. *Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 2004.	Día 6 y 6,5	Vitrificación	Grupo 1: 40% etilenglicol en PBS Grupo 2: 40% etilenglicol + 18% ficoll + 0,3 M sucrosa en PBS Grupo 3: 40% etilenglicol + 18% ficoll + 0,3 M trehalosa en PBS	0.8±1.1 26.7±26.6 19.2±8.01

Cuadro comparativo de los resultados obtenidos en criopreservación de embriones. En algunos trabajos, a falta de transferir los embriones in vivo, se muestran los resultados in vitro obtenidos por los autores.

REFERENCIAS BÁSICAS

Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. In New Trends in Embryo Transfer, edn. 1. Eds A. Lauria & F. Gandolfi. Cambridge: Portland Press.

Cabrera P., A. Fernández, P. Bastidas, M. Molina, A. Bethencourt, T. Díaz. Vitrification: an embryo cryopreservation alternative. Rev. Fac. Cienc. Vet., 2006, 27(1), 9-23.

Carnevale E.M., W.D. Eldridge-Panuska, V. Caracciolo di Brienza, G.E. Seidel, E.L. Squires. Embryo development rates alter vitrification and transfer of equine embryos. Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, 2004.

Carnevale E.M., W.D. Eldrige-Panuska, V. Caracciolo di Brienza. How to collect and Vitrify Equine Embryos for Direct Transfer. IVIS (en línea) 2004 (4 Dec 2004); P1472.1204.

Castanheira P.N., D.C.G Amaral, A.B. Vasconcelos, R.M.E. Arantes, R.Stahlberg, M.A. Lagares. Cryopreservation of equine embryos by vitrification. Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, 2004.

Eldridge-Panuska W. D., V. Caracciolo di Brienza, G.E. Seidel, E.L. Squires, E.M. Carnevale. Establishment of pregnancies afer serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. Theriogenology, 2005, 63, 1308-1319.

Hochi S, Maruyama K, Oguri N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. Theriogenology 1996;46:1217-1224.

Hudson J., P. McCue, M. Carnevale, S. Welch, E. Squires. The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. J. Equine Vet. Sci., 2006, 26(2), 51-54.

Logan N.L., P.M. McCue, M.A. Alonso, E.L. Squires. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. Anim. Reprod. Sci., 2006, 102, 48-55.

Mousa M., I. Bersinger, P.Doligez, F. Guignot, G. Duchamp, M. Vidament, P. Mermillod, J-F. Bruyas. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow cooling and open-pulled-straw (OPS) vitrification. Theriogenology, 2005, 64, 1619-1632.

Mousa M., I.Bersinger, P.Doligez, F.Guignot, G. Duchamp, M. Vidament, J-F. Bruyas, P. Mermillod. Slow freezing vs open pulled straw (OPS) vitrification for equine embryo cryopreservation. Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, 2004.

Oberstein N., M.K. Donovan, J.E. Bruemmer, G.E. Seidel, E.M. Carnevale, E.L. Squires. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. Theriogenology, 2001, 55, 607-613.

Saragusti J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction 2011, 141;1-19.

Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. J. Reprod. Fertil 1982 (Suppl 32):399-403.

Yarin S, Arav A. Measurement of essential physical propierties of vitrification solutions. Theriogenology 67;81-89.