



Archivos de Medicina Veterinaria

ISSN: 0301-732X

archmv@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

CELESTINOS, M.; GATICA, R.

Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos

Archivos de Medicina Veterinaria, vol. XXXIV, núm. 2, 2002, pp. 157-165

Universidad Austral de Chile

Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013743002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



Archivos de medicina veterinaria

ISSN 0301-732X *versión impresa*

 [Texto completo PDF](#)

 [Como citar este artículo](#)

 [Agregar a favoritos](#)

 [Enviar a e-mail](#)

 [Imprimir HTML](#)

Arch. med. vet. v.34 n.2 Valdivia 2002

Arch. Med. Vet., Vol. XXXIV, N° 2, 2002, pp. 157-165

REVISIONES BIBLIOGRAFICAS

Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos

Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation

M. CELESTINOS, M.V.Z.; R. GATICA, M.V., Ph.D.

Instituto de Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, CHILE. E-mail: mcelestinos@hotmail.com

Summary

Over the last 40 years cells and embryos of mammals have been preserved, at room temperature, refrigeration temperature and by different cryoconservation methods. These techniques have evolved into more simple, practical and less expensive freezing procedures. One of these is vitrification, a process of solidification that uses a highly concentrated solution which does not crystallize during freezing; its viscosity increases with the descent of the temperature until the formation of an amorphous solid state similar to glass. For this reason, exposure and freezing rates should be quick enough to avoid toxicity and the formation of intracellular ice, which can cause

solution for their later freezing. Several vitrification procedures have been published about embryo preservation, using different cryoprotectants, concentration, volume, addition method, temperatures, exposition time, freezing rate, thawing procedure and dilution, to maintain the function, normal structure and viability of the embryo. These techniques have also been experimented with in vitro and in vivo produced embryos, at different developmental stages. This paper aims to review the present bovine embryo cryopreservation methods, particularly vitrification, as well as to mention the latest procedures and progress so that new researchers may have an updated literature review to start their works.

Key words: vitrification, cryopreservation, embryos.

Resumen

Desde hace más de 40 años se han conservado células y embriones de mamíferos, a temperatura ambiente, en refrigeración y por los diferentes métodos de crioconservación. Estas técnicas han ido evolucionando en procedimientos de congelación más simples, prácticos y menos costosos, uno es la vitricación de embriones, proceso de solidificación, en el cual se utiliza una solución altamente concentrada que no cristaliza durante el congelamiento, en tanto que su viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo semejante al vidrio. Por esto, la exposición y las tasas de congelamiento deben ser lo suficientemente rápidas para evitar la toxicidad y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar al embrión. Para que los embriones soporten el choque osmótico, deben equilibrarse con una solución crioprotectora de menor concentración antes de exponerse a la solución vitrificante para su posterior congelación. Se ha publicado gran cantidad de técnicas de vitricación para embriones, utilizando diferentes crioprotectores, concentración, volumen, método de adición, temperaturas, tiempo de exposición, tasa de congelación, descongelación y dilución, para mantener la función, estructura normal y viabilidad del embrión. Estas técnicas también se han experimentado en embriones producidos *in vitro* como in vivo y en diferentes etapas de desarrollo. El presente trabajo pretende dar una visión general de los métodos de conservación y en particular de la vitricación de embriones bovinos, así como mencionar los últimos avances y procedimientos para tener una buena base bibliográfica a partir de la cual emprender las diferentes investigaciones.

Palabras claves: vitricación, crioconservación, embriones.

INTRODUCCION

El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia; controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas; crear bancos de embriones de valor pecuario, entre otras. Los registros de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones revelan que más del 50% de 500.000 embriones de bovino transferidos en los últimos años han sido usados después de ser congelados y descongelados ([Thiber, 1997](#)).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc.; es decir, reducir drásticamente la actividad fisiológica de la célula. Así es posible almacenar embriones durante un largo período sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos ([Schneider y Mazur, 1984](#); [Gordon, 1994](#); [Tanaka col., 1997](#)). Este hecho, convierte a la congelación de embriones en una herramienta insustituible para el comercio internacional de reproductores.

La crioconservación de embriones considera, no sólo los estudios en relación a las técnicas y crioprotectores a usar para obtener altas tasas de sobrevivencia embrionaria. También estudia los cambios celulares ocurridos durante estos procesos, lo que está revisado por [Dobrinisky \(1996\)](#).

rutinario en biologa, ganaderia y medicina, pudiendo lograrse por procedimientos de congelacin estandar y por vitrificacin. La principal diferencia que tiene la vitrificacin con el mtodo estandar es que en este ltimo la concentracin de crioprotectores es menor y el descenso de temperatura se realiza de manera controlada mediante equipos programables ([Fahning y Garca, 1992](#)). A pesar de los beneficios prcticos, ventajas econmicas y buenos resultados que se han obtenido experimentalmente, la vitrificacin no se ha utilizado masivamente debido a la falta de estandarizacin de los protocolos. De ah el motivo del presente trabajo, que pretende dar una visin general de los mtodos de conservacin y en particular de la vitrificacin de embriones bovinos, as como de mencionar los ltimos avances y procedimientos para tener una buena base bibliogrfica a partir de la cual emprender las diferentes investigaciones.

CRIOPROTECTORES

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formacin de cristales que lesionan las estructuras citoplasmicas ([Mazur, 1984](#)). Esta deshidratacin se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelacin. En la congelacin de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

PERMEABLES O INTRACELULARES: De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfdo (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la clula penetrando a sta para ayudar a proteger el citoplasma ([Miyake y col., 1993](#)).

IMPERMEABLES O EXTRACELULARES: De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azucres ([Kuleshova y col., 1999](#)), estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presin osmtica sin penetrar a la clula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las clulas de los embriones durante el equilibrio ([Sommerfeld y Nieman, 1999](#)).

Los crioprotectores previenen la deshidratacin total y la degeneracin proteica, causada por la congelacin del agua intra y extracelular durante el proceso. Adem, no deben ser txicos a los embriones. Para reducir el dao osmtico y txico del crioprotector, debido a la alta concentracin de sales, se ha dejado de utilizar G y DMSO para hacer uso de EG, solo o en combinacin con sucrosa o trealosa que ha demostrado ser menos txico ([Dochi y col., 1990](#); [Leeuw y col., 1994](#)). Dado su bajo peso molecular, el EG tendra una mayor velocidad de penetracin y, por ende, necesitaría menor tiempo de exposicin, disminuyendo su efecto txico ([Saha y col., 1996](#)).

Se ha demostrado lo importante que es el estado de desarrollo embrionario en la velocidad de penetracin del crioprotector. [Leibo \(1977\)](#) demostró que la permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa luego de la fecundacin, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa. Esto se debera a la diferencia que existe en la relacin rea/volumen en un embrión en los primeros estadios del desarrollo.

La etapa del desarrollo ms apropiada para la vitrificacin en etilenglicol es la mórula compacta y blastocisto temprano de embriones producidos *in vivo o in vitro* ([Cocero y col., 2000](#)), as como tambin se ha demostrado que embriones producidos *in vitro* tienen menor tolerancia a la congelacin debido a la formacin de hielo intracelular, aumento en la concentracin de lpidos y enzimas que digieren la zona pelúcida, lo que los hace ms sensibles al enfriamiento y a la invasin de virus, bacterias y hongos ([Saha y col., 1995](#); [Semple y col., 1995](#); [Kobayasi y col., 1994](#); [Le Gal y Massip, 1999](#); [Dattena y col., 2000](#)). Otro aspecto a considerar es la calidad de los embriones a vitrificar, ya que cuando se congelan embriones de buena calidad, se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular ([Humbolt y col., 1987](#)).

Está claro que la congelabilidad de los embriones mamíferos vara con la especie del animal. Esta diferencia de especie está claramente establecida entre embriones bovinos, porcinos y equinos. Sin embargo trabajos recientes demuestran que embriones de bovinos, ovinos, ratones y conejos tienen un comportamiento similar a la congelabilidad ([Hasler y col., 1995](#); [Sommerfeld y Niemann, 1999](#); [Saha y col., 1996](#)).

Los embriones pueden ser conservados, *in vitro*, para su posterior transferencia mediante: Cultivo a temperatura ambiente, refrigeración entre 0 °C a + 4 °C ó congelación a -196 °C.

CONSERVACION A TEMPERATURA AMBIENTE. Un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de embriones recuperados de una donadora antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% suero, una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial favorece la sedimentación, evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio. La viabilidad embrionaria declina después de 12 horas ([Palma y Brem, 1993](#)).

REFRIGERACION. Ha quedado claro que embriones de bovinos mantenidos en un medio no nutritivo por un largo tiempo y a temperatura ambiente decrecen ampliamente su capacidad de desarrollo, este desarrollo puede ser preservado si los embriones se refrigeran de 0 a 4 °C por no más de 24 horas ([Refsdal y col., 1988](#)). La refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador. Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura, de manera similar a como se realiza la estabilización del semen ([Landsverk y col. 1992](#)). La refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la congelación.

CONGELACION ESTANDAR. El método de congelación estándar posibilitó a [Wilmut y Rowson \(1973\)](#) obtener el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado. Al método estándar se le han efectuado desde entonces distintas modificaciones tendientes a su simplificación.

En el método de congelación estándar la exposición de los embriones al medio de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente (20 - 22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración ([Chupin y Procureur, 1984](#); [Niemann, 1991](#)). Este período incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas. Esto permite realizar más rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o "seeding" ([Maurer, 1978](#)). Las pajuelas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajuelas con la del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajuela con una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido (NL₂); el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor.

El no inducir la cristalización conduce a la formación de cristales de hielo bajo un estado de súperenfriamiento y a una elevación repentina de temperatura (se genera calor latente de -10° - -15 °C), resultando un severo trauma físico que puede dañar las células ([Niemann, 1995](#)).

Una vez efectuado el seeding, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (período de estabilización) y luego se desciende a una velocidad de entre 0.1 y 0.5 °C hasta -30 ó -35 C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, en este momento las pajuelas pueden ser retiradas del equipo de congelación y sumergidas en nitrógeno líquido ([Lehnjensen y Greve, 1982](#)). La descongelación se realiza de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en baño María a 30 ó 35 °C durante 20-30 segundos.

CONGELACION RAPIDA. Método desarrollado por [Chupin \(1986\)](#). Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, luego se les deshidrata nuevamente colocándolos en una solución mixta de glicerol y sucrosa. Esta segunda deshidratación deja a los embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el cuello del termo de nitrógeno, durante 5 minutos, posteriormente son sumergidas al NL. Los resultados obtenidos fueron dispares, según el estadio de desarrollo del embrión congelado. [Martino y col. \(1996\)](#) realizaron modificaciones, congelando ovocitos en gradillas de microscopio electrónico con 1 µl de EG sumergiéndolas inmediatamente en NL. Obteniendo tasas de sobrevivencia semejantes a los de ovocitos expuestos al EG, pero sin congelamiento.

VITRIFICACION. La vitricación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un

[y Fahy, 1985](#)).

Durante el proceso de vitricación, el embrión esta sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento. Esto se debera a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor nmero de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y as la concentracin del soluto va aumentando en los espacios que aun no se congelan. Este choque osmtico es conocido como "efecto solucin", y puede llegar a ser daao para la sobrevivencia del embrión ([Scheider y Mazur, 1984](#)), debido a la prdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas qumicas y osmticas de las clulas a dichos efectos.

Para obtener buenos resultados se deben tomar en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentracin de crioprotector, mtodo de adicin, temperatura y tiempo de equilibrio, solidificacin, tasa de enfriamiento y cambios en el volumen ([Arav y col., 2000](#)), debido a que estos factores estn estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector ([Miyake y col., 1993](#)).

El mximo dao en el embrión durante el enfriamiento ocurre de -15 a -16 °C debido a la fase de transicin de la membrana lipdica. Esta fase se ve afectada por la fusin de los liposomas afectando el termocomportamiento de las membranas en la transicin de lquido a gel ([Zeron y col., 2000](#)) y la velocidad de penetracin de los crioprotectores ([Thompson, 1997](#); [Pugh y col., 2000](#)). El dao celular incluye prdida de microvellosidades, disrupcin de la membrana plasmtica, cambios mitocondriales, hinchamiento del retculo endoplsmico, prdida de uniones entre clulas as como fractura de zona pelúcida ([Edashige y col, 1999](#); [Ohboshi y col., 1998](#)).

TECNICAS DE VITRIFICACION. Antes de la vitricación, los embriones deben ser equilibrados con el crioprotector a temperatura ambiente. La metodologa descrita por [Sheffen y col. \(1986\)](#) indica que la exposicin a la solucin de equilibrio (SE) (10% G + 20% PG en PBS) debe realizarse a temperatura ambiente (20 °C), durante 10 minutos y la exposicin a la SV (25% G + 25% PG) a 4 °C. [Dobrinisky y col. \(1991\)](#) deshidrataron al embrión en SE (10% G y 25% PG) por 7 minutos a 20 °C, pasando a SV (25% G y 25% PG) manteniendo la misma temperatura hasta introducirlo al NL.

[Dochi y col. \(1990\)](#) y [Kasai \(1996\)](#) equilibraron mórulas y blastocistos bovinos (10% G + 20% 1-2 Propanodiol) durante 10 minutos, luego los expusieron a SV (25% G + 25% 1-2 Propanodiol + sucrosa 1M en PBS), inmediatamente despus de cerrada, la pajuela se introdujo lenta y progresivamente en el nitrgeno para que se produzca simultneamente la vitricación de los compartimentos extra e intracelulares, lo que posibilitó transferir los embriones a campo. Utilizando estas soluciones se obtuvo porcentajes de preñez del 50%, demostrando que son soluciones estables con poca tendencia a cristalizar durante el enfriamiento.

[Sommerfeld y Niemann \(1999\)](#) vitrificaron embriones bovinos producidos in vitro (IVP) con EG 1.5 – 1.8 M, teniendo porcentajes de desarrollo del 42%. [Dochi y col. \(1995\)](#) utilizaron 40% EG, 20% PVP y 11,3% trealosa, para determinar la toxicidad de la vitricación con relacin a la temperatura y tiempo de exposicin. El tratamiento fue llevado a cabo a 20 °C, durante 5 minutos, en PBS, obteniendo tasas de desarrollo del 84%.

[Rall y Fahy \(1985\)](#) y [Massip y col. \(1987\)](#) vitrificaron embriones de ratón de 8 clulas, éstos se equilibraron progresivamente a 4 °C, con DMSO 20.5%, acetamida 15.5%, PG 10% y PEG 6% en PBS Dulbeco modificado, luego se sumergieron en NL. Los embriones sobrevivieron despus de ser cultivados *in vitro* y se obtuvieron nacimientos vivos en un 39.1%.

[Vajta y col. \(1996a\)](#) equilibraron embriones de 7 das en SV al 50% (12.5% EG y 12.5% DMSO + 75% PBS) a temperatura ambiente durante 5 minutos, fueron transferidos a SV al 100% (25% EG y 25% DMSO) a 4 °C durante 20 segundos y posteriormente sumergidos en nitrgeno, obteniendo altas tasas de preñez con blastocistos tempranos. [Dhali y col. \(2000\)](#) utilizaron una combinacin de EG 3.5M y DMSO 3.4M con un tiempo de equilibrio de 3 minutos obteniendo tasas de desarrollo del 69%. [Yang y col. \(2000\)](#) probaron la adicin de PVP (10%) y Trealosa (0.3M) obteniendo porcentajes de preñez del 50% en embriones producidos *in vitro* y 55% en embriones producidos *in vivo*.

sin afectar el desarrollo hasta blastocisto sobre los controles.

La misma tcnica se ha usado tambin para vitricar embriones posterior a una eclosin asistida de los blastocistos ([Vajta y col., 1997b](#)) sin afectar el desarrollo posterior sobre los controles. [Saito \(1994\)](#), [Saito e Imai \(1997\)](#), [Donnay y col. \(1998\)](#) vitricaron blastocistos de bovinos en tres pasos 1) 5 minutos (Sucrosa 0.1M, Xilosa 0.1M, PG 1%, G 10%,.); 2) 5 minutos (Sucrosa 0.1M, Xilosa 0.1M, PG 1%, Glicerol 10%, EG 10%) 3) 1 minuto (Sucrosa 0.1M, Xilosa 0.1M, PG 1%, G 10%, EG 20%), en Dulbecco-PBS a temperatura ambiente y posteriormente sumergidos en NL. Obteniendo tasas de desarrollo del 72%, 88,9% y 71% respectivamente. [Kaidi y col. \(2000\)](#), [López y López \(2000\)](#) utilizaron la misma tcnica empleando embriones de ovinos y conejos, mejorando los resultados antes mencionados. Este mtodo, en dos pasos, haba sido descrito por [Sheffen y col. \(1986\)](#) en embriones de ratn, obteniendo resultados similares a los de sus colegas, ms no as [Viscarra \(1996\)](#).

La descongelacin puede realizarse exponiendo las pajuelas a temperatura ambiente durante 10 segundos antes de colocarlas en bao Mara 30-35 °C, 20-30 segundos ([Rall y Meyer, 1986](#)). En sta debe estar presente un agente permeable extracelular como la albmina sérica bovina (BSA) que proteja y estabilice las membranas celulares para que no se detenga el transporte de agua a travs de stas, evitando que la clula sufra lisis durante la difusin del crioprotector y dao en la capa trofoblstica ([Saha y col., 1996](#); [Massip y col., 1987](#)).

Los crioprotectores pueden ser removidos de los embriones en tres y seis pasos en forma escalonada, hasta lograr una concentracin final de PBS sin crioprotector. [Saito \(1994\)](#) utilizó dos pasos sucrosa 0.5M. y 0.25M, manteniendo al embrión durante cinco minutos en cada una. El embrión tambin puede transferirse en forma directa. [Leibo \(1984\)](#) desarrolló tcnicas que permiten extraer el glicerol dentro de la pajuela, modificacin conocida como "mtodo de un solo paso en pajuela", donde la variacin radica en la disposicin de las distintas soluciones (0.24M sucrosa, 1.4M G con el embrión y 0.25M sucrosa en PBS divididas las soluciones por columnas de aire).

Esta tcnica permite transferir embriones congelados a campo sin necesidad de equipos y laboratorios muy costosos, obteniendo tasas de preñez que oscilan entre el 30 y el 50 %. Cuando el glicerol es extraído dentro de la pajuela, los porcentajes de preñez se pueden ver afectados por prescindir de la evaluacin morfolgica ([Niemann, 1991](#)).

En los últimos trabajos realizados en vitricación se ha intentado reducir al máximo el dao celular, por los crioprotectores, su concentracin y su volumen. Esto llevó a [Vajta y col. \(1997c, 1998\)](#) a ensayar una tcnica de vitricación denominada OPS (Open Pulled Straw) que consiste en adelgazar una pajuela plstica de 0.25 ml, calentándola sobre una platina y estirándola en su parte central hasta que su diámetro interior llegue a 0.7- 0.8 mm. Luego de enfriada la pajuela es cortada en su parte ms delgada. El embrión es recogido por la parte ms fina de la pajuela mediante capilaridad y luego esta es inmediatamente sumergida en NL. Embriones de 8 das sobrevivieron al cultivo en un 81% utilizando este mtodo.

[Kong y col. \(2000\)](#) vitricaron en una ultra mini pajilla (1.0 – 0.8 mm de diámetro) para reducir el dao por el alto volumen de la SV, obteniendo tasas de desarrollo a la descongelacin y cultivo del 72%.

Recientemente se ha ensayado el uso de diferentes tipos de contenedores para vitricación de embriones, como son las gradillas de cobre para microscopio electrnico ([Martino y col., 1996](#)) y las mallas de nylon ([Matsumoto y col., 2001](#)). En estos contenedores se logró vitricar de 15 a 65 embriones a la vez. Los resultados obtenidos utilizando estas tcnicas de vitricación fueron similares a sus controles y ofrecen una nueva alternativa para criopreservar gran nmero de embriones.

CONCLUSIONES

El resultado de la vitricación est condicionado previamente por dos factores. La calidad del embrión y el estado de desarrollo embrionario. Cuando se congelan embriones de calidades muy buena y buena se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular.

vitro.

Para elegir el mejor mtodo de vitricación se deben tomar en cuenta diferentes factores como son los siguientes: crioprotectores a utilizar, estos deben manejarse en adecuada concentracin, adicionarse al embrión en forma creciente y a tiempos determinados, en combinacin con otros crioprotectores que sean de baja toxicidad, para que sean utilizados con el menor volumen posible, temperatura de adicin y con tasas de enfriamiento lo suficientemente rpidas para evitar la prdida del equilibrio osmtico y causar dao celular que comprometa la viabilidad embrionaria.

BIBLIOGRAFIA

ARAV, A., Y. ZERON, A. OCHERENTY. 2000. A new device and method for vitrication increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 247. Abst.

COCERO, M. J., S. MORENO, B. AGUILAR. 2000. Ultraestructure of in vivo-produced sheep embryos after cryopreservation in glicerol or ethilene glicol. *Theriogenology* 53: 250. Abst.

CHUPIN, D., R. PROCUREUR. 1984. Glicerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts: Effect of number of steps an of total duration. *Theriogenology* 21: 230. Abst.

CHUPIN, D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology* 25: 219. Abst.

DATTENA, M., G. PTAK, P. LOI, P. CAPPAL. 2000. Lambing rate following transfer after vitrication of in vitro and in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology* 53: 252. Abst.

DHALI, A., R. S. MANIK, S. K. DAS, S. K. SINGLA, P. PALTA. 2000. Effect of ethylene glycol concentration and exposure time on post vitrication survival and in vitro maturation rate of buffalo oocytes. *Theriogenology* 53: 253. Abst.

DOBRINSKY, J. R., F.F. HESS, R. T. DUBY, J. M. ROBL. 1991. Cryopreservation of bovine embryos by vitrication. *Theriogenology* 37: 20. Abst.

DOBRINSKY, J. R. 1996. Cellular aproach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45: 17-26.

DOCHI, O., H. TAKAKURA, K. IMAI. 1990. Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrication. *Japanese J. of Anim. Repr.* 36: 69-72.

DOCHI, O., K. IMAI, H. TAKANURA. 1995. Birth of calves after direct transfer thawed bovine embryos. Stored frozen in ethilene glicol. *Anim. Repr. Sci.* 38: 179-185.

DONNAY, I., P. AUQUIER, S. KAIDI, C. CAROLAN, P. LONERGAN, P. MERMILLOD, A. MASSIP. 1998. Vitrication of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim. Repr. Sci.* 52: 93-104.

EDASHIGE, K., A. ASANO, T. A. ZHU, M. KASAI. 1999. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitricated mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology* 38: 273-280.

FAHNING, M. L., M. A. GARCÍA. 1992. Status of cryopreservation of embryoos from domestic animals. *Cryobyology* 29: 1-18.

FAHY, G., D. MAC FARLENE, C. ANGELL, H. MERYMAN. 1984. Vitrication as an aproach to cryoconservation. *Cryobiology* 21: 407-426.

GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. *Ed. Cab Internacional*. UK.

Theriogenology 43: 141-152.

HUMBOLT, P., J. PERRIN, N. JEANGUYOT, M. NIBART, M. THIBER. 1987. Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology* 27: 240.

KAIDI, S., I. DONNAY, F. DESSY, A. MASSIP. 2000. Effect of freezing or vitrification on the quality of in vitro - produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 53: 266.

KASAI, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrificatin of mammalian embryos. *Anim. Repr. Sci.* 42: 67-75.

KOBAYASI, S., M. TOMITA, J. W. POLLARD, S. P. LEIBO. 1994. Survival of cryopreserved porcine embryos vitrified in ethylenglicol plus polyvynilpyrrolidone. *Theriogenology* 41: 228.

KONG, I. K. S. I. LEE, Y. T. IM, S. G. CHO, H. J. OHH, I. H. BAE. 2000. Improvement of post-thaw hatching rates of in vitro-produced bovine embryos vitrified by ultra-mini straw. *Theriogenology* 53: 258.

KULESHOVA, L. L., D. R. MAC FARLENE, A. O. TROUNSON, J. N. SHAW. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification propertis of ethilene glicol – based solutiouns and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38: 119-130.

LANDSVERK, K., U. JAAKMA, I. MUURSEPP, A. O. REFSDAL, E. VALDEMANN. 1992. A field experiment comparing pregnancy rates in the bovine after tranfer of embryos stored at 4°C and frozen-thawed embryos. *Proceedings of the 12th International Congress on Anim. Repr. The Hague* 3: 1448-1450.

LEEuw, A. M., W. J. H. DAAS, W. F. RALL. 1994. Pregnancy rates in a comparative field trial of vitrificati3n and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology* 41: 326.

LE GAL, F., A. MASSIP. 1999. Cryopreservation of cattle oocytes: Efects of meiotic stage, cyclohexamide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology* 38: 290-300.

LEHNJENSEN, H., T. GREVE. 1982. The survival of cow blastocysts frozen in 1,4M glicerol after plunging between -15 and -60 and rapid thawing. *Theriogenology* 17: 95

LEIBO, S. 1977. In: *The freezing of mammalian embryos*. K. Elliott and J. Whelan, (eds.), CIBA Foundation Symposium. Elsevier/Excerpta Medica. pp. 125-127.

LEIBO, S. 1984. A one step method for direct nonsurgical transfer o frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790.

L3PEZ, M. B., F. G. L3PEZ. 2000. In vitro and in vivo survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 53: 259.

MARTINO, A., N SONGSASEN, S.P. LEIBO. 1996. Development into Blastocysts of bovine ocytes cryopreserved by ultra rapid cooling. *Biology of Reproduction* 45: 1059-1069.

MASSIP, A., P. VAN DER ZWALMEN, F. HECTORS. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 7: 270-273.

MATSUMOTO, H., J.Y. JIANG, T. TANAKA, H. SASADA, E. SATO. 2001. Vitrification of large quantities of inmatute bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobyology* 42: 139-144.

MAURER, R. 1978. Freezin of mammalian embryos: A review of the techniques. *Theriogenology* 9: 45-68.

MAZUR, P. 1984. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mamalian ova and

MIYAKE, T., M. KASAI, S. E. ZHU, T. SAKURAI, T. MACHIDA. 1993. Vitrication of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylen based solution by a simple method. *Theriogenology* 40: 121-134.

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

NIEMANN, H. 1995. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived in vitro and in vivo. In: Enne, G., G. F. Greppi, A. Lauria. (eds.). Reproduction and Animal Breeding, Advances and Strategy. Elsevier, Amsterdam. pp. 117-128.

OHBOSHI, S., N. FUJIHARA, T. YOSHIDA, H. TOMAGANE. 1998. Ultraestructure of bovine in vitro-produced blastocysts cryopreserved by vitrication. *Zygote* 6: 17.

PALMA, G. A., G. BREM. 1993. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproduccin en la especie bovina. Hemisferio Sur. Argentina.

PUGH, P. A., H. R. TERVIT, H. NIEMANN. 2000. Efects of vitrication medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw - dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Anim. Repr. Sci.* 58: 9-22.

RALL, W. F., G. M. FAHY. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by *vitricación*. *Nature* 313: 573- 575.

RALL, W. F., T. K. MEYER. 1986. Fracture damage to de zonae of mammalian embryos cryopreservation and its avoidance. *Cryobiology* 23: 557-558.

REFSDAL, A. H. KJAESTAD, T. VATN. 1988. Transfer of refrigerated bovine embryos. Proceedings 11th International Congress on Anim. Prod. and AI. Dublin Ireland. Vol. 2: 186.

SAHA, S., R. RAJAMAHENDRAN, A. CECE, T. SUZUKI. 1995. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture following vitrication and one – step rehydratation. *Theriogenology* 43: 311.

SAHA, S., T. OTOI, M. TAKAGI, A. BOEDIONO, C. SUMANTRI, T. SUZUKI. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethilene glycol, trealose and polivinilpyrrolidone. *Cryobiology* 33: 291-299.

SAITO, N. 1994. Manual of embryo transfer and in vitro fertilization in cattle. National livestock Breeding Center. Japan. pp: 75-80.

SAITO, N., K. IMAI. 1997. The effect of addition of various monosacharides to vitrication solution on the survival of bovine blastocysts produced in vitro. *Cryobiology and Cryotechnolgy* 43: 34-39.

SCHNEIDER, U., P. MAZUR. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survirval of frozen – tawed embryos. *Theriogenology* 21: 68-79.

SEMPLE, M. E., K.J. BETTERIDGE, S. P. LEIBO. 1995. Cryopreservation of in vitro derived bovine embryos produced in a serum – free culture sistem. *Theriogenology* 43: 320.

SHEFFEN, B., P. VAN DER ZWALMEN, A. MASSIP. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrication. *Cryo – Lett.* 7: 260-269.

SOMMERFELD, V., H. NIEMANN, 1999. Cryopreservation of bovine in vitro Produced Embryos Using Ethylenglicol in Controlled Freezing or Vitrication. *Cryobiology* 38: 95-105.

TANAKA, H., P. BALLARALE, J. MASAKI, H. KANAGAWA. 1997. Teoría y Practica de la fecundación in vitro. Capitulo V. JICA. Chile.

- THOMPSON, J. G. 1997. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 341-354.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1996a. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. *Anim. Repr. Sci.* 45: 191-200.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1996b. Cumulative efficiency of biopsy, vitrification and in straw dilution in a bovine in vitro embryo production system. *Theriogenology* 45: 162. Abst.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997a. Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 47: 501-509.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997b. Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *Theriogenology* 111: 65-70.
- VAJTA, G., P.J. BOOTH, P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997c. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters* 18: 191-195.
- VAJTA, G., P. HOLM, M. KUWAYAMA, P.J. BOOTH, H. JACOBSEN, T. GREVE, H. CALLESEN. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoijuries of bovine ova and embryos. *Molec. Reprod. and Dev.* 51: 53-58.
- VISCARRA, T. R. 1996. Evaluación de la tcnica de vitricación, como método de crioconservación en embriones de ratón al estado de mórula y blastocisto temprano. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias; Valdivia, Chile.
- WILMUT, I., L. ROWSON. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
- YANG, B. C., H. H. SEONG, G S. IM, S. J. PARK, W. K. CHANG, I. C. CHEONG. 2000. Effects of vitrification methods and polyvinylpyrrolidone supplementation on the viability of immature bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 266.
- ZERON, Y., M. TOMCZAK, J. CROWE, A. ARAV. 2000. Electrofusion of bovine oocytes with different liposomes changes the membrane thermobehavior and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 53: 267.

Aceptado: 27.06.2002