



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ENSAYO SOBRE CONGELACION Y DESCONGELACION
RAPIDA EN EMBRIONES DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A N

MARGARITA ALTAMIRANO DOMINGUEZ

ESTEBAN TORRES GARCIA

MEXICO, D. F.

1985



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Congelación y descongelación de embriones de mamíferos	3
Aspectos teóricos del proceso de congelación y descongelación	3
Crioprotectores	4
Desarrollo embrionario	7
Congelación y descongelación de embriones de mamíferos	9
Técnica de congelación de embriones	10
Técnica de descongelación de embriones	11
Viabilidad de embriones de mamíferos	14
OBJETIVO	16
MATERIAL Y METODOS	18
Material	19
Metodología	20
Técnica de obtención de embriones	20
Técnica de congelación	22
Técnica de descongelación	22
Discriminación morfológica	23
Discriminación por tinción	23
RESULTADOS	24
Pruebas de Viabilidad	25
Tablas Viabilidad	30
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	40
Apéndice : soluciones	42
BIBLIOGRAFIA	44

RESUMEN

En el presente trabajo se aplicó el congelamiento y descongelamiento rápido a embriones de rata de 8 y 16 blastómeras y blastocistos, determinándose su viabilidad después de dicho tratamiento, con el fin de poder implementar una técnica eficaz, sencilla y económica para preservar embriones de importancia económica.

Por estudios previos se ha determinado que los embriones de mamíferos son viables después del congelamiento y descongelamiento realizados en forma lenta.

En nuestro caso, para alcanzar el objetivo reducimos el tiempo total de congelación de embriones de rata en un proceso de dos pasos, los mantuvimos congelados durante distintos tiempos y los descongelamos rápidamente para aplicarles las pruebas de viabilidad.

Los embriones se congelaron hasta -76°C , en un tiempo aproximado de un minuto, y de esta temperatura se pasaron a nitrógeno líquido (-196°C), donde se mantuvieron. Los embriones fueron almacenados de esta forma en un período de 8 a 117 días

La descongelación se llevó a cabo pasando los embriones del nitrógeno líquido a un baño con agua a temperatura de 40°C , en donde al cabo de un minuto se encontraban descongelados. Después se determinó la viabilidad de los embriones siguiendo los criterios morfológico y por exclusión de colorante.

Los porcentajes de viabilidad encontrados fueron buenos si son comparados con aquellos reportados por otros estudios que utilizan la técnica lenta.

Se encontró que los estadios embrionarios de 16 blastómeras y blastocistos, presentaron una mayor viabilidad que el estadio de 8 blastómeras, obteniéndose los siguientes resultados: 74 % para blastocistos, 68% para embriones de 16 blastómeras y un 21 % para embriones de 8 Blastómeras.

Se discuten algunas ventajas de la técnica y se hace mención de sus futuros alcances.

INTRODUCCION

CONGELACION Y DESCONGELACION DE EMBRIONES DE MAMIFEROS

Aspectos teóricos del proceso de Congelación y Descongelación

La Criobiología o congelamiento biológico es una disciplina que ha sufrido un gran desarrollo en los últimos años, dado que comprende técnicas que permiten el mantenimiento de células, órganos o bien organismos en estado viable a baja temperatura durante un tiempo indefinido.

Muchos intentos que sobre congelación se hicieron a principios del siglo XX en huevos y embriones de anfibios y aves, fracasaron. Ya en el periodo de 1940 a 1950 se realizaron los primeros experimentos de importancia sobre congelación de espermatozoides, hongos y levaduras, sometidos a temperaturas un poco superiores a 0° C, y se encontró que dichas células permanecieron viables por algún tiempo; sin embargo, se observó que al bajar la temperatura disminuía la viabilidad celular, por lo que se consideró imposible conservar el material biológico a temperatura de congelación (bajo cero). Los investigadores lo explicaron como debido a que células sometidas a estas temperaturas tan bajas sufren lesiones irreversibles, ocasionadas por los cambios que ocurren durante el proceso de congelación y descongelación (Montoya, 1969).

La experimentación demostró más adelante, que el congelamiento produce daños que se pueden incluir en dos mecanismos (Meryman, 1966; Montoya, 1969) :

Físicos : formación de cristal de hielo, esto es, nucleación del cristal de hielo con el subsecuente crecimiento; así, puesto que la molécula del agua cambia en disposición espacial al pasar del estado líquido al sólido se provoca la ruptura de estructuras celulares.

Fisico-químicos :

a) desnaturalización de gran cantidad de compuestos celulares a consecuencia del aumento en la concentración de electrolitos, lo cual modifica la estructura secundaria y terciaria de las proteínas provocando un choque osmótico;

- b) suspensión de reacciones bioquímicas que requieren una temperatura más alta ;
- c) suspensión de reacciones catalizadas por enzimas, que son inactivadas a baja temperatura;
- d) suficiente deshidratación para precipitar proteínas en solución ;
- e) cambios en el pH .

Crioprotectores

Las observaciones anteriores llevaron a los investigadores a la búsqueda de algunas sustancias cuyas características físico-químicas ayudaran a impedir el daño causado por la formación de cristales de hielo, o sea evitar que el agua intracelular cambie de estado líquido a sólido.

En 1940, Luyet Gehenia (Meryman, 1966) observó que la mayoría de las células u organismos que se congelaban sufrían una deshidratación, y que si el congelamiento era lento, ésta era mayor. Se observó que muchas células recobraban la viabilidad después del congelamiento gracias a la previa adición de ciertas sustancias " protectoras de congelamiento ". Se empezaron a probar sustancias complejas como la leche, el suero o bien compuestos que evitaran la deshidratación celular así como la formación de cristales de hielo. Fué hasta 1949 cuando Polge, Smith y Parkes utilizaron glicerol para congelar espermatozoides de bovino , observando que éste puede evitar los efectos causados a la célula por el proceso de congelación y descongelación. A estas sustancias se les llamó en términos generales crioprotectores (Maurer, 1978) .

En 1969 Montoya enumera una serie de requerimientos que cualquier sustancia postulada como crioprotector debía cumplir :

- a) penetrar fácilmente;
- b) evitar la formación de cristales de hielo;
- c) reducir la deshidratación celular por choque osmótico;

d) presentar un punto de ebullición alto, ya que protegerá mejor a la célula al ser congelada.

Se han realizado muchas investigaciones para determinar que tipo de daño específico causa el congelamiento y cual es el mecanismo de acción del crioprotector. Para la primera cuestión debe considerarse fundamentalmente si el congelamiento es lento o rápido. Hay una cantidad considerable de información que relaciona el daño celular durante el congelamiento y descongelamiento con la cantidad de hielo intracelular formado, así, cualquier método de preservación de células involucra la utilización de técnicas diseñadas para evitar o minimizar este hielo intracelular. Sin embargo, las células pueden ser dañadas por el medio ambiente de solutos concentrados durante el congelamiento lento. La teoría del doble factor de daño por congelamiento propuesta por P. Mazur y colaboradores (1970) describe adecuadamente esta situación donde una recuperación máxima es obtenida por medio de la congelación a una velocidad suficientemente baja para evitar el hielo intracelular, pero lo suficientemente rápida que minimize el efecto dañino del medio ambiente sobre la célula .

D. Pribor posteriormente (1975) propuso también una teoría a la que llamó teoría multifactor de crioprotección que incluía tanto interacciones biológicas entre los agentes crioprotectores y las membranas celulares como parámetros físicos. Los factores puramente físicos incluyen las propiedades coligativas de los agentes protectores, la permeabilidad de las membranas celulares al agua y a otros solutos, las velocidades de congelación y descongelación, el tiempo y temperatura de exposición a temperaturas subcero, la velocidad de crecimiento del cristal de hielo, y la presencia y velocidad de recristalización. La interacción biológica se refiere a las interacciones con la membrana celular, que es un sistema dinámico existiendo en uno de varios posibles estados estables. Mientras ciertos disturbios producen cambios en la membrana reversibles,

otros resultan en cambios irversibles. El cambio dependerá del tipo de membrana celular involucrada tanto como de los factores físicos que causan la alteración.

La explicación de la acción de crioprotección de cualquier agente parece así ser consecuencia de la explicación de daño celular a la que uno se apegá (Meryman, 1971). De esta forma , para tratar de explicar la acción del crioprotector que evita el daño celular, debemos considerar que se han establecido empíricamente dos clases de agentes crioprotectores (Mc Gann, 1978), los que penetran y los que no penetran, y que cumplen su función por diferentes mecanismos; aunque ha sido mencionado (Pribor, 1975) que los agentes crioprotectores no deben ser encasillados en 2 ó 3 tipos sino en un espectro más amplio con propiedades diversas.

Crioprotectores que penetran como el glicerol y el dimetil sulfoxido (DMSO) entre otros, funcionan evitando la concentración de solución extracelular y reduciendo así, la deshidratación celular a un grado tolerable. Los crioprotectores que no penetran como el polivinil pirolidona (PVP) basan su habilidad crioprotectora en que capacitan a la membrana celular para permitir una salida reversible de solutos bajo estrés osmótico (Meryman, 1971).

Se han considerado agentes crioprotectores los siguientes : etilen glicol, acetato de amonio, PVP, glicerol, DMSO, etc. Diferentes concentraciones de las sustancias anteriores han sido probadas para encontrar las más adecuadas para proteger a distintos tipos celulares contra el daño por congelación. Dentro de los crioprotectores más usados actualmente se encuentran el glicerol y el DMSO.

El DMSO ($(CH_3)_2SO$) es un compuesto altamente polar, miscible en agua, higroscópico, cristalino y que en concentraciones altas es tóxico. Su punto de ebullición es 189°C. Es estable en concentraciones alcalinas o neutras. Su átomo central es el azufre, unido por doble ligadura al átomo de oxígeno, lo cual le

confiere una marcada electronegatividad para captar hidrógenos. Se ha clasificado como un crioprotector penetrante y se ha realizado la rapidez de su penetración (Meryman, 1971).

El glicerol ($C_3H_5(OH)_3$) por presentar grupos funcionales OH, es considerado un compuesto fuertemente electronegativo, lo cual le permite la formación de puentes de hidrógeno. Presenta un punto de ebullición de 290°C. McGann (1978) indicó que la permeabilidad de las células al glicerol era muy baja a 0°C y alta a 20°C, lo que permitía que el glicerol fuese usado tanto como un agente penetrante como no penetrante.

Se ha descrito en eritrocitos de paloma (Hunter, 1970) , que el movimiento del glicerol a través de su membrana es debido a un mecanismo de difusión facilitada y no de difusión simple, es decir, que existe un sistema acarreador en la membrana, lo cual explicaría su amplia variabilidad en la capacidad de penetración. En cambio, del DMSO ha sido mencionada como una característica particularmente atractiva su penetración rápida y aparentemente universal dentro de las células (Meryman, 1971) lo que parece indicar un proceso de difusión simple.

Montoya (1969) postuló que el DMSO y el glicerol penetrante entran a través de la membrana celular y captan las moléculas de agua en proporción de tres de agua por una de DMSO o de glicerol, ésto por medio de puentes de hidrógeno, evitando así que el agua forme cristales y actuando entonces como amortiguadores .

Desarrollo embrionario

Diversos han sido los tipos celulares, de también diversas especies, utilizados en los procesos criobiológicos, tales como eritrocitos, espermatozoides, células miocárdicas, epidérmicas, hepáticas, pancreáticas, y aun embriones. Esta variedad conforma un rango amplio de procesos de interacción entre los distintos tipos celulares y los crioprotectores , la técnica de congelación y la técnica de descongelación. Por el modelo bioló

gico elegido para este estudio, es pertinente ahora mencionar brevemente algunas características del desarrollo embrionario.

El desarrollo embrionario es un proceso biológico gradual cuyo fin es alcanzar una estructura y funcionalidad predeterminadas genéticamente. Un embrión es una estructura funcional adecuadamente adaptada a sus necesidades y a su medio ambiente en cada una de las etapas de su desarrollo.

El huevo fecundado se divide progresivamente por medio del proceso conocido como segmentación y que dará origen a una serie de células más pequeñas denominadas blastómeros. Las divisiones son siempre mitóticas y cada célula hija recibe la serie completa de cromosomas. El racimo resultante de blastómeros agrupados se denomina mórula, por su semejanza a una mora. En este momento, los blastómeros tienden a disponerse alrededor de un espacio libre central. Su subdivisión continuada produce la blástula.

De aquí continúa el proceso de gastrulación y enseguida la organogénesis con la que finaliza el desarrollo que se lleva a cabo durante la vida embrionaria.

El tiempo de desarrollo embrionario dura en la rata aproximadamente 21 días.

Daniels en 1971, dió los intervalos de tiempo para los estadios del desarrollo embrionario en el aparato reproductor de ratón o de rata :

Tiempo (horas)	Estadio (número de células)
de 0 a 29	1
de 29 a 52	2
de 42 a 59	de 3 a 4
de 49 a 60	de 5 a 8
de 68 a 77	de 16 a 32 (paso a la unión uterotubal)
de 74 a 82	blastocistos

Congelación y descongelación de embriones de mamífero

Estudios pioneros sobre congelación de embriones se publicaron desde 1950, y reportaron que muy bajo porcentaje de embriones continuaba su desarrollo después de congelados y descongelados (Maurer, 1978). Hasta 1971 D.G. Whittingham logró desarrollar in vitro e in vivo embriones de ratón que habían sido congelados a -79°C , mantenidos ahí por más de 30 minutos y posteriormente descongelados. Con esto inició una línea de trabajo que ha estado avocada durante años a este aspecto que considera uno de los factores más importantes en la búsqueda del preservamiento de embriones. Whittingham enfatizó desde el inicio de sus estudios en los muchos beneficios del proceso de congelación y descongelación lenta comparados con los escasos beneficios del proceso rápido (Whittingham, 1972), estableciendo los rangos óptimos de 0.2 a 2°C por minuto en la congelación y de 4 a 25°C por minuto en la descongelación. En su estudio de 1979, anota que siempre y cuando se congele lentamente hasta -80°C y después se pase rápidamente hasta -196°C ya no importa la velocidad de descongelación; por el contrario, una congelación rápida requiere, según el autor, una descongelación rápida. Concluye que se obtienen mucho mejores resultados con la congelación y descongelación lenta, que con la congelación y descongelación rápida o con la congelación lenta y descongelación rápida. Con ello quedo establecido un método de congelación en dos pasos que será muy utilizado por investigadores del congelamiento embrionario tales como Wood y Farrant que en 1980 establecieron tiempos "mínimos" de congelación de embriones de ratón que iban de 15 a 20 minutos en total.

En este mismo año Kasai, Niwa e Iritami modificaron la técnica de congelación de dos pasos de Whittingham a una de tres pasos, llevando los embriones a tres temperaturas sucesivas(-20 , -100 , -196°C) y la descongelación la realizaron a temperatura ambiente o a 30°C considerándola rápida.

Con estas investigaciones se ha implementado el almacenamiento de embriones utilizando diversas técnicas para congelar y descongelar , aplicándolas a diferentes especies de mamíferos y a diferentes estadios embrionarios.

Técnica de congelación de embriones

La técnica para congelar puede ser relativamente simple o altamente sofisticada; las técnicas más comúnmente utilizadas comprenden los siguientes pasos : los embriones colectados se lavan dos veces, ya sea en solución salina balanceada de fosfatos (PBS) o bien, en un medio de cultivo para embriones (Whittingham, 1972, 1975, 1976, 1979; Kasai, 1980, 1981). Posteriormente los embriones son colocados en recipientes que pueden ser tubos, ampolletas, etc., conteniendo el total o una parte de la concentración del agente crioprotector; éste puede ser DMSO, glicerol, etilenglicol, etc. (Meryman, 1971), a diferentes concentraciones en PBS, o bien en medio de cultivo y se mantienen por 15 minutos a 0°C (Whittingham 1976; Miyamoto , 1977, 1978; Leibo y Mazur, 1974) o a 10°C (Whittingham, 1975) .

Realizado lo anterior se procede al congelamiento. Este se lleva a cabo con lentitud hasta los -196°C, temperatura a la cual se almacenan los embriones. El congelamiento lento se realiza en la forma siguiente : se baja la temperatura lentamente hasta aproximarse a -40° ó -79°C, con velocidades de congelación que van de 0.3 a 2°C por minuto (Whittingham, 1972 ; Miyamoto, 1978), de -79° a -120°C, con una velocidad de 1° a 2°C por minuto (Miyamoto, 1978) y de -120°C va directamente a nitrógeno líquido que le proporcionará la temperatura de -196°C.

Otra forma de congelar es usar hielo seco con acetona o etanol al 95%. El hielo seco se adiciona a la acetona para alcanzar los valores deseados de congelación (-76°C); la lenti

tud del congelamiento requiere de una atención constante. También se puede usar el aparato MacDonald para congelar (Maurer 1978).

En 1979, como ya se mencionó, Whittingham y cols. describieron la preservación de embriones de ratón almacenados a -196°C , usando dos etapas de congelación a la cual llamó rápida. Congelaron embriones de ratón de 8 células y blastocistos a una velocidad lenta (de 0.3° a 0.6°C por minuto) hasta -80°C , y después los transfirieron a nitrógeno líquido, usando en este estudio 1.5 M de DMSO.

En la técnica de congelación de Wood y Farrant ya referida utilizaron 1.5 M de DMSO, y en la de Kasai y cols. (1980) se usó 1.5 y 2.0 M también de DMSO.

Para mayor detalle ver el Cuadro I que es una recopilación de muchos de los diferentes métodos de congelación y descongelación propuestos por algunos autores.

Las técnicas de congelación no solo se han aplicado a célas de los animales de laboratorio "clásicos", sino que también se han congelado embriones de conejo (Anderson y Foots, 1975; Whittingham, 1976) y borregos y vacas (Maurer, 1978) principalmente, usando como crioprotector DMSO al 1.5 M . El congelamiento se realizó en forma lenta obteniéndose resultados semejantes a los observados para embriones de ratón y rata (Maurer, 1978).

Técnica de descongelación de embriones

No es necesario un equipo especial para descongelar los embriones, ya que se pueden usar baños a varias temperaturas, controlándose la velocidad de descongelación, que la mayoría de los estudios propone como lenta. Las velocidades de descongelación van de 4° a 25°C por minuto (Whittingham, 1972) , o bien, se pueden descongelar en aire a temperatura ambiente, con una velocidad aproximada de 15°C por minuto (Miyamoto ,

Cuadro I

CARACTERISTICAS DEL METODO CONGELACION-DESCONGELACION EN EMBRIONES

	WHITINGHAM (1972)	LEIBO (1974)	WHITTIN (1975)	WHITTIN (1976)	MIYAMOTO (1977)	MIYAMOTO (1978)	WHITINGHAM (1979)	KASAI (1980)	WOOD Y FA RRANT(1980)
Especie	ratón	ratón	rata	conejo	ratón	rata y ratón	ratón	ratón	ratón
Estadio	8 B' y Bt''	2 y 8B	2,4,8B	4,8,16B	8 B	8 B	8 B	8 M	8 B
Crioprotec tor	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	glicoles varios	DMSO	DMSO	DMSO
Concentra ción	2M'''	2M	1.5M	1.5M	1.5M	1.2-1.5M	1.5M	1.0-2.5M	1.5M
Exposición al criopro tector	15 min. a 0°C	15 min. a 0°C	15 min. a 0°C	15 min. a 0°C	30 min. 10°C	10 min. a 0°C	15 min. 25°C	10 min. a 0°C	--
Congelación °C/minuto	0.3-2.0	0.2-2.0	idem. 1972	0.7-0.9	0.5	0.5	0.2-0.8	0- 8 -8- -20 -20- -100	20 6 25
Descongela ción °C/min.	4-25	4-25	5-24	12-15	15	15	275-500	directo en agua (30)	directo en agua (30)
Viabilidad	mayor en 8 B	--	11% de preferenz	74% <u>in vitro</u>	50% <u>in vitro</u>	baja en rata ratón 86 % <u>in vitro</u>	--	8 % <u>in vitro</u>	66 % de preferenz

B' blastómeras, Bt'' blastocisto, M''' molar.

El cuadro muestra algunos ejemplos de la diversidad metodológica de las fases del pro
ceso de congelación-descongelación de embriones.

1978). Fué de nuevo Whittingham y cols. los que disminuyeron el tiempo de descongelación, efectuándolo a una velocidad de 275°-500°C por minuto. Kasai y cols. (1980) también modifican el tiempo de descongelación a 360°C por minuto y Wood y Farrant a su vez, descongelan rápidamente pasando los embriones a un baño de 37° ó 40°C agitándolo. En el Cuadro I se muestran de una manera resumida algunas variaciones de esta técnica.

Una vez descongelados los embriones, el crioprotector es diluido en varias etapas, lo que reducirá el daño osmótico que puede ocasionarles el cambio brusco a solución salina. Esto puede hacerse por la adición de pequeños volúmenes de una solución isotónica o bien, por la transferencia de los embriones a soluciones con menor concentración de crioprotector , o por la dilución de soluciones de diferente osmolaridad, lo cual rápidamente baja la concentración del crioprotector. La temperatura a la cual el crioprotector es diluido parece ser dependiente de la temperatura a la cual fué adicionado antes (Maurer, 1978).

VIABILIDAD DE EMBRIONES DE MAMIFEROS

El término viabilidad denota la capacidad de una unidad biológica para mantenerse viva, e implica la presencia de una "fuerza vital" en esa unidad. En sí, el término aplicado a una entidad biológica le significa que está viva o es capaz de vivir, a diferencia de la entidad no viable o muerta que es incapaz de vivir (Malinin y Perry, 1967).

La concepción de muerte es considerada como absoluta en carácter, pero para propósitos científicos es conveniente dividir en estados el proceso de transición del estado de viabilidad al estado donde todas las funciones vitales han cesado. Tales estados han sido designados convenientemente por M. D'Halluin desde 1895 (Malinin y Perry, 1967) y son los siguientes :

- Entidades aparentemente muertas; implica que todas las apariencias detectables de funciones vitales tales como la respiración, circulación y actividad motora no se presentan.
- Entidades relativamente muertas; condición del cuerpo y sus componentes individuales, entre el cese de actividad cardíaca y respiratoria y la muerte absoluta.
- Entidades absolutamente muertas; condición en la que la recuperación del cuerpo como un todo o la reactivación de la función fisiológica de las células y organismos individuales es imposible.

Para la criobiología la determinación y la definición precisa del daño celular irreversible es uno de los puntos más importantes .

Muchos sistemas de pruebas son empleados comúnmente para la determinación de la viabilidad, en conjunción con los estudios de congelamiento y mantenimiento. La variedad de los procedimientos de laboratorio es muy amplia, sin embargo, puede ser distribuida en categorías más simples :

- a) cultivo de tejidos;
- b) permeabilidad de las membranas citoplasmáticas;
- c) incorporación de nucleótidos;
- d) espectro enzimático;
- e) transplante;
- f) alteración estructuras, composición química y electroconductividad.

La mayoría de los métodos que han sido utilizados para evaluar la calidad de los embriones son los basados en los criterios b y f, esto es, en las observaciones de los detalles morfológicos tales como desarrollo, simetría y densidad de los blastómeros y en la exclusión del colorante.

Whittingham y Adams (1976) hacen notar que el aspecto morfológico es el primer paso a determinar en la valoración embrionaria. Por otra parte, las pruebas de exclusión de colorante están basadas sobre la premisa de que una membrana celular intacta es necesaria para mantener la vida de la célula. Desde 1914 fué observado por Evans y Schulmans que existía una relación entre las células vivas y su habilidad para excluir azul de tripano (Malinin y Perry, 1967). Las células muertas, por el contrario, al tener deteriorada su membrana permiten el paso fácil del colorante.

OBJETIVO

Tomando en cuenta la información a nuestro alcance, que ha sido reseñada aquí brevemente, es posible apreciar su gran cantidad y diversidad y los numerosos usos que se le puede dar.

La mayoría de las técnicas las podemos calificar de altamente sofisticadas, en tanto que recurren a múltiples aparatos y a innumerables sustancias en busca de alta precisión y eficacia. Consideramos que este tipo de equipo no sería posible obtener y mantener en sitios que no sean laboratorios de altos recursos, lo cual limita grandemente su utilización. El contar con una técnica de congelación y descongelación fiable y sencilla, la haría accesible al vasto medio rural de nuestro país .

Pensando en ésto, es que nos propusimos el presente estudio, tratando de elaborar una técnica casi tan eficiente como las descritas, pero más rápida y más modesta en requerimientos y costo en general, y por lo tanto más fácil de implementar en laboratorios rústicos. Para ello partimos, además de la información disponible, de una base metodológica probada por nuestro laboratorio para la obtención de algunos tipos celulares viables (hígado, riñón, músculo) después del congelamiento y descongelamiento, considerando asimismo la opinión de Whittingham (1979) en el sentido de que en cualquier tipo celular la respuesta al proceso de congelamiento y descongelamiento parece ser similar.

De esta forma, nuestro Objetivo General fué el implementar una técnica de congelación y descongelación rápida que proporcione embriones viables. Para alcanzarlo nos planteamos entonces los siguientes Objetivos Específicos :

- a) Elaborar una técnica de congelación rápida para embriones de rata en diferentes estadios .
- b) Mantener los embriones congelados durante distintos tiempos.
- c) Determinar la viabilidad embrionaria .

M A T E R I A L

Y

M E T O D O S

MATERIAL

Biológico

Ratas machos y hembras (Rattus norvegicus, cepa Wistar) de tres meses de edad, que habían tenido un solo parto y con un peso aproximado de 200 gramos.

No biológico

1.- Para citología exfoliativa:

2 pipetas Pasteur, vaso de precipitado de 50 ml , porta y cubreobjetos, microscopio de contraste de fases Olympus 202 665, solución salina de Hanks.

2.- Para obtención de embriones :

Tabla de operaciones, gasa, ligas, tijeras, pinzas de diente de ratón, tijera de punta fina, pinzas de relojero, 3 vasos de precipitado de 150 ml, caja de Petri con división , mechero, 2 jeringas de tuberculina, 2 agujas del # 27, aguja sin bisel, 6 portaobjetos excavados, microscopio de disección Swift 730674 y microscopio invertido Olympus CK 202 878, 2 vasos de precipitado chicos, estufa de 37°C, éter , benzal, alcohol, agua destilada y solución salina de Hanks.

3.- Para congelación rápida y almacenamiento :

ampolletas, soporte, pinzas largas, vaso de precipitado de 50 ml, recipiente que contiene nitrógeno líquido (-196°C) acetona, hielo seco, glicerol al 7% y DMSO al 3% en medio de Eagle.

4.- Para descongelación rápida ;

vaso de precipitado de 500 ml, pinzas largas, segueta, pipeta Pasteur con punta curva.

5.- Para pruebas de viabilidad :

Morfológica- microscopio invertido, portaobjetos excavados, pipetas Pasteur.

Tinción- portaobjetos excavados, pipeta Pasteur, microscopio invertido, azul de tripano y solución salina de Hanks.

NOTA: Tanto el material como las soluciones estuvieron estériles, además las pipetas Pasteur, porta y cubreobjetos se silicizaron.

METODOLOGIA

Todas las fases descritas a continuación se realizaron en un área estéril (campana de cultivo).

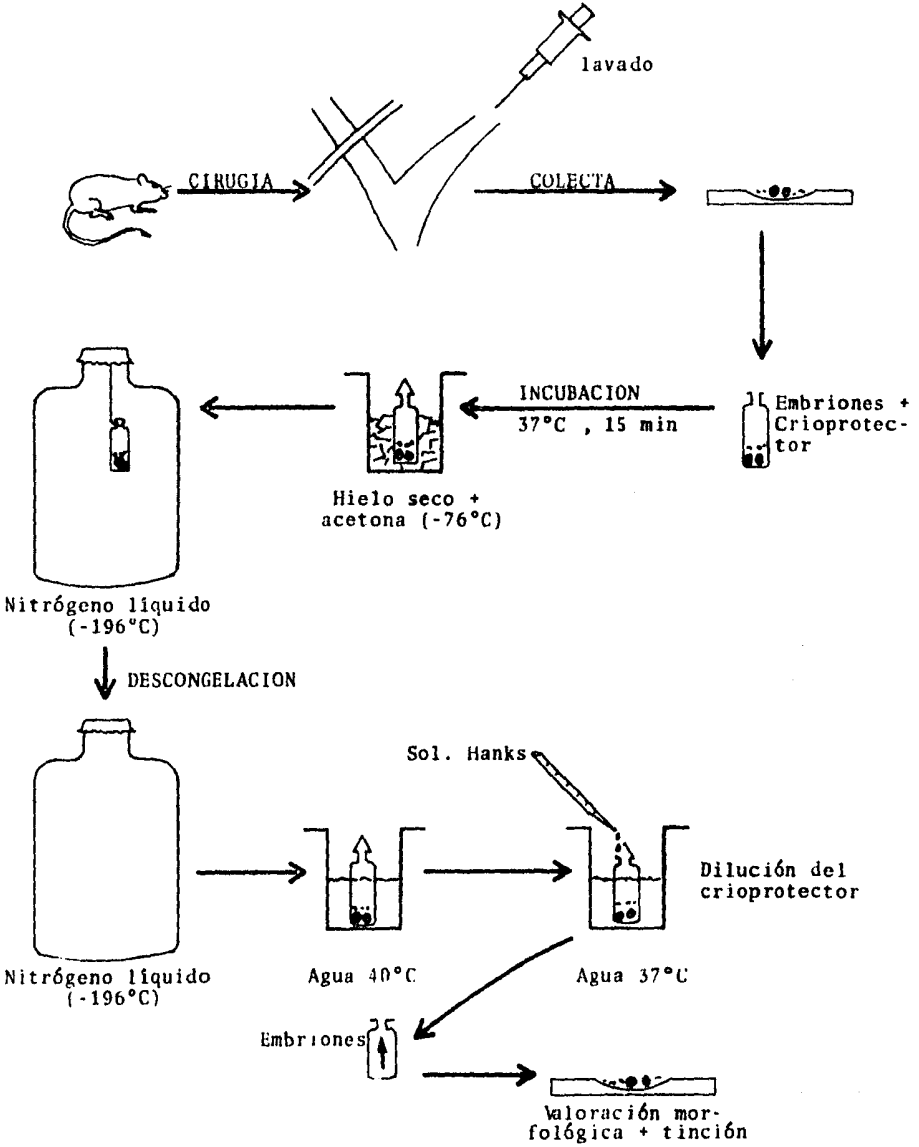
Técnica de obtención de embriones

A un lote de embriones se le examinó la citología vaginal durante dos semanas por medio de citología exfoliativa, ésto con el fin de observar el tipo celular y determinar la etapa del ciclo estral en la que se encontraban las ratas y que dura 5 días; de esta forma se verificaba que su ciclo estral fuese normal. Para ello se realizaba lo siguiente : se tomaba una pipeta Pasteur de 1 ml con solución salina de Hanks y se introducía a la vagina de la rata succionando para sacar la muestra y ponerla en un portaobjetos. Comprobado lo anterior se seleccionaban las ratas que estaban en proestro poniéndolas entonces con el macho. Al día siguiente, usando la misma técnica se buscaba la presencia de espermatozoides, lo que se tomaba como referencia de que había habido fecundación.

La obtención de embriones se realizaba 3 días después de la presencia de espermatozoides, colectándose embriones de 8 células, y de nuevo 4 días después, obteniéndose embriones de 16 células y blastocistos tempranos.

La colecta de embriones se efectuaba de la forma siguiente (ver Fig. 1 para esquema general de metodología): la rata era anestesiada con éter, luego se sujetaba con ligas a la tabla de operaciones; después de lavar la piel con benzal, se abría la parte ventral en forma de hoja de libro; ya localizado el aparato reproductor se quitaba el exceso de grasa de éste, se cortaba el oviducto en la parte proximal al ovario y también aproximadamente a tres cuartas partes del útero; el fragmento se colocaba en una caja de Petri con solución salina de Hanks a 37°C y se lavaba aquí, por fuera para quitar la sangre, y por dentro con una jeringa que también contenía solución de Hanks para obtener los embriones del oviducto. Este úl-

Fig.1 PASOS DE LA CONGELACION Y DESCONGELACION



timo lavado se recogía en un portaobjetos excavado. Toda esta parte del porceso se realizaba utilizando el microscopio de disección, pasando ahora el fragmento al microscopio invertido para localizar los embriones y valorar su morfología.

Técnica de congelación

Los embriones se tomaban con una pipeta Pasteur conteniéndo una mínima cantidad de medio, y se pasaban a una ampolleta que contenia glicerol al 7% y DMSO al 3% en medio de Eagle (7 ml de glicerol, 3 ml de DMSO, 90 ml de medio de Eagle) lo que dá una relación de 1 DMSO : 2.33 glicerol. La cantidad aproximada de embriones era de 20, los cuales fueron incubados a 37° C por 15 minutos, sellando la ampolleta con un soplete tipo Blowpipe (aire, gas) y posteriormente colocando la ampolleta en un vaso de precipitado de 200 ml con hielo seco y agregándo le acetona. Al observar que el líquido estaba congelado (-76° C), aproximadamente después de un minuto, se pasaba la ampolleta a la canastilla y se introducía al recipiente que contenia nitrógeno líquido (-196° C).

Técnica de descongelación

Después de mantener los embriones por un tiempo que iba desde una semana hasta 3 meses y medio, se sacaba la ampolleta del recipiente, se colocaba en un vaso de precipitado con agua a temperatura de 40°C y se mantenía en él hasta que la solución se descongelaba (aproximadamente un minuto). La ampolleta se abría entonces, manteniéndola en un vaso de precipitado con agua a 37°C y agregándo gota a gota medio de Eagle sin crioprotector a intervalos de un minuto, hasta alcanzar el doble de volúmen inicial. Después de lo anterior, los embriones se pasaban a un portaobjetos excavado y se lavaban dos veces en solución de Hanks, aplicándose entonces las pruebas de viabilidad .

Discriminación morfológica

Los embriones ya descongelados y en el portaobjetos eran llevados al microscopio invertido para analizar sus características morfológicas . Se observaban con los objetivos de 10X , 20X y 100X, y si se fotografiaban se hacía con 10X y 20X. Se tomaba en cuenta la integridad de la zona pelúcida y la membrana, la simetría y densidad de cada uno de los blastómeros y su aspecto en general, comparándolos con las características de embriones viables sin tratamiento.

Discriminación por tinción

Posterior a la valoración morfológica , se lavaban dos veces con solución salina de Hanks , agregando una gota del colorante azul de tripano dejándolos en ella por 5 minutos; posteriormente se pasaban a la solución salina de Hanks para quitar el exceso de colorante y se llevaban al microscopio invertido para distinguir los que habían retenido el colorante y los que no. El blastómero que captaba al colorante se consideraba como no viable , y aquél que lo excluía se tomaba como viable. Si tan sólo un blastómero captaba el colorante el embrión era ya considerado no viable.

Como prueba testigo se puso colorante a embriones viables y no viables sin tratamiento.

RESULTADOS

PRUEBAS DE VIABILIDAD

Discriminación morfológica

Como ya se describió, los embriones descongelados fueron evaluados considerando sus características morfológicas tales como integridad, densidad y simetría de los blastómeros, comparándolos para ello con embriones viables sin tratamiento.

La serie de figuras 2A, 3A y 4A son las imágenes de embriones sin tratamiento, pudiendo apreciarse en ellos el blastómero integro, la simetría aparente y la zona pelúcida intacta, respectivamente.

La serie de figuras 2B, 2B y 4B corresponden a imágenes de embriones con tratamiento, pudiendo observarse la conservación de las mismas características que denotan integridad morfológica.

Las figuras 5A y 5B son de embriones después del tratamiento: con la mitad de los blastómeros dañados (5A) y con todos los blastómeros dañados (5B).

Exclusión de tinción

En esta prueba fue muy evidente cuando los blastómeros captaban el colorante y cuando no. Desafortunadamente de aquellos que lo captaron no fué posible tomar fotografías que lo mostraran. De esta prueba pudo establecerse una clara correlación entre los blastómeros que absorbían el colorante y los que presentaban características morfológicas de no viables. Si sólo un blastómero de todo el embrión retenía el azul de tripano y/o evidenciaba deterioro morfológico se consideraba al embrión no viable.



Fig. 2A Embriones de 8,16 blastómeras (b)
antes de congelar. Se observa
integridad en las blastómeras ;
objetivo 10X

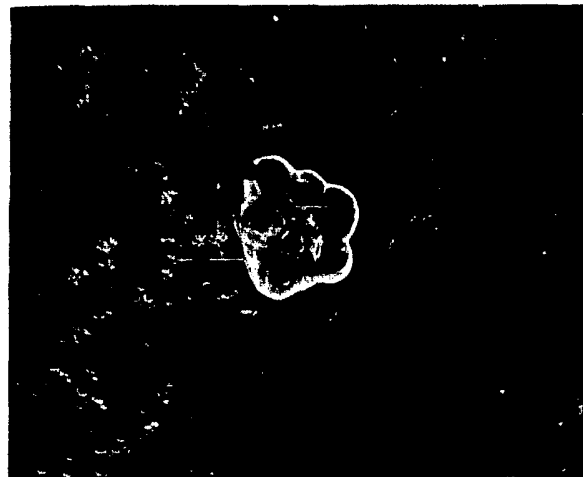


Fig. 2B Embriones de 8 blastómeras
después del tratamiento. Es
apreciable la integridad en
las blastómeras y simetría
entre ellas ;
objetivo 20X

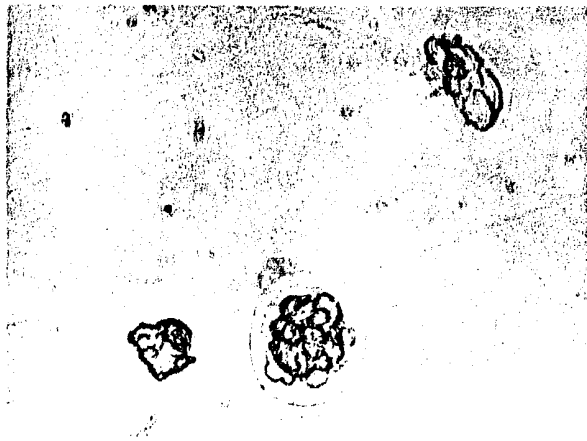


Fig. 3A Embriones de 16 blastómeras
antes de congelar. Simetría
aparente;
objetivo 20X

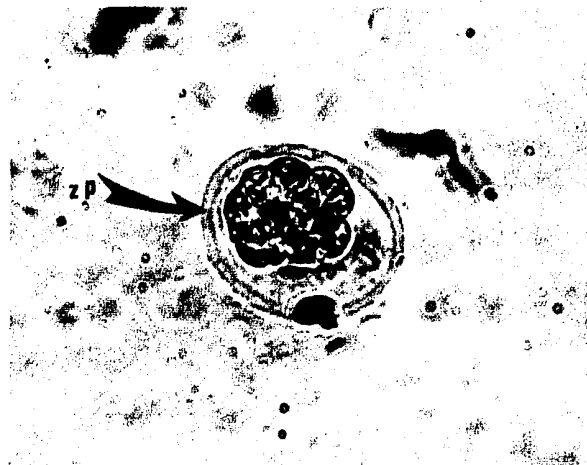


Fig. 3B Embriones de 16 blastómeras
después del tratamiento. Se
observa zona pelúcida (zp)
íntegra y simetría entre las
blastómeras;
objetivo 20X

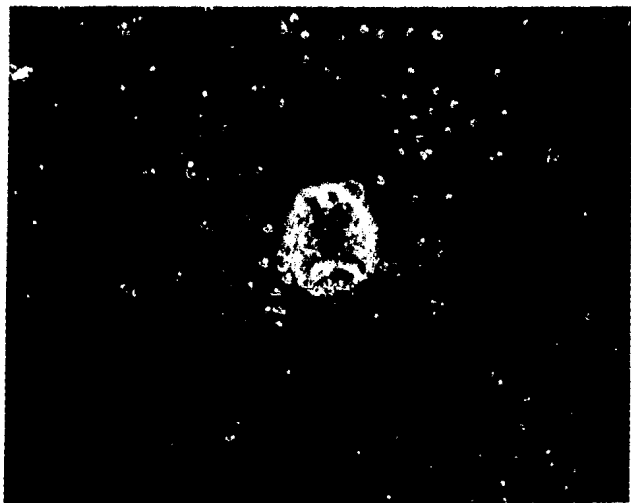


Fig. 4A Blastocisto antes de congelar
con zona pelúcida integra;
objetivo 20X

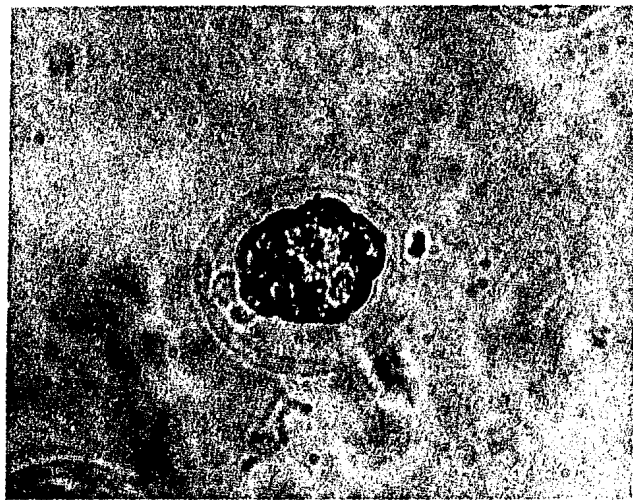


Fig. 4B Blastocisto después del tra-
tamiento simetria entre las
blastómeras;
objetivo 20X



Fig. 5A Embriones de 8 blastómeras
después del tratamiento
con la mitad de las blastó
meras dañadas;
Objetivo 20X



Fig. 5B Embriones de 8 blastómeras
después del tratamiento
con todas las blastómeras
dañadas;
Objetivo 20X

TABLAS DE VIABILIDAD

En base a las pruebas morfológicas y de exclusión del colorante se sacaron los porcentajes de viabilidad y se ordenaron en la Tabla I (pág.31).

En ella se observa que la mayor viabilidad se presenta en el estadio de blastocisto con 74%, le sigue el estadio de 16 blastómeros con 68%, y por último el estadio de 8 blastómeros con 21% de viabilidad.

Dentro del estadio de 8 blastómeros se presentó el mayor porcentaje en los embriones congelados por 41 días (5 de 10) y la menor en los embriones congelados durante 8 días (1 de 13).

En el estadio de 16 blastómeros, la mayor viabilidad fué dada para embriones congelados por 8 días (19 de 26) y la menor para los de 90 días (7 de 12).

Finalmente , para los blastocistos el mayor porcentaje de viabilidad se encontró en los embriones congelados 8 días (4 de 4) y la menor en la de 89 días.

Tomando sólo tiempos constantes para los 3 estadios (8 y 90 días), considerando para ello en el estadio de 8 blastómeros los 89 como 90 días y promediando en el estadio de blastocisto los valores correspondientes a los tiempos de 84, 86 y 89 días para tomarlos como 90 días , pudimos elaborar la Tabla II y la figura 6 (pág.32).

Con el arreglo de los datos presentados en la Tabla II se pretende evidenciar más las diferencias porcentuales existentes en la viabilidad para los 3 estadios. Con estos mismos datos se elaboró la Fig. 6 que permite visualizar mejor la tendencia de los estadios embrionarios hacia una mayor viabilidad conforme es más avanzado el desarrollo.

ESTADIO EMBRIONARIO	TIEMPO CONGELADOS (en días)	No. DE EMBRIONES	No. DE EMBRIONES VIABLES	No. DE EMBRIONES NO VIABLES	VIABILIDAD OBSERVADA
8 BLASTOMEROS	8	13	1	12	21 %
	19	6	2	4	
	41	10	5	5	
	43	8	2	6	
	56	5	3	2	
	89	20	4	16	
		<u>62</u>	<u>17</u>	<u>45</u> (15*)	
16 BLASTOMEROS	8	26	19	7	68 %
	90	12	7	5	
		<u>38</u>	<u>26</u>	<u>12</u> (4*)	
BLASTOCISTO	8	4	4	0	74 %
	84	10	8	2	
	86	3	2	1	
	89	5	1	2	
	117	3	2	1	
		<u>25</u>	<u>17</u>	<u>6</u> (3*)	

Tabla I . Viabilidad observada en los embriones de 8 y 16 blastómeros y blastocistos, después de ser congelados, mantenidos a distintos tiempos y descongelados.

* Embriones que presentaron la mitad de blastómeros viables después del tratamiento .

Estadio	Tiempo congelación (días)	Núm. embriones congelados	Núm. embriones viables	% viabilidad
8 blastómeros	8	13	1	8%
	90	20	4	20%
16 blastómeros	8	26	19	73%
	90	12	7	58%
blastocisto	8	4	4	100%
	90	16	11	67%

Tabla II. Haciendo un promedio de los tiempos de congelación mostrados en la Tabla I se elaboró ésta para mostrar más claramente las diferencias entre los 3 estadios embrionarios en sus porcentajes de viabilidad (para detalles ver texto).

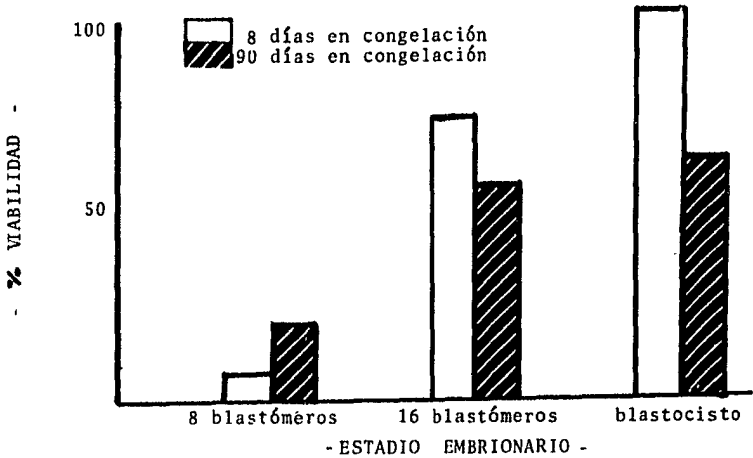


Fig. 6 Histograma que permite observar la tendencia de los estadios embrionarios a presentar una mayor viabilidad después del tratamiento, conforme es más avanzado su desarrollo.

DISCUSSION

El desarrollo de un método de preservación de embriones que sea eficaz, rápido y barato, implica una enorme dificultad, dada la gran cantidad de factores que lo conforman, como son: la elección de estadios embrionarios apropiados, su colecta y manipulación in vitro, los procedimientos de congelación y descongelación, y aspectos tales como establecer parámetros de discriminación entre embriones viables y no viables, su cultivo y su trasplante, ya que todos ellos juegan un papel integrador al evaluar la calidad de un método de preservación de embriones. De esta forma, cada paso incluye una elección entre varias posibilidades muchas veces no bien exploradas.

En principio, el estadio embrionario para rata reportado como más viable después del proceso de congelación era el de 8 blastómeros (Whittingham, 1979; Wood y Farrant, 1980). Por otro lado, nosotros hicimos algunas pruebas preliminares con embriones de 2, 4, 8, y 16 blastómeros y blastocistos, y encontramos que los estadios de 16 blastómeros y blastocistos eran más fáciles de coleccionar, más manejables y soportaban más tiempo el medio salino sin degenerarse, además de que respondían mejor al tratamiento; por lo tanto, decidimos realizar el estudio sobre los estadios de 8 y 16 blastómeros, y blastocistos.

El uso de crioprotectores ha sido muy diverso, encontrándose toda una gama útil de ellos (glicerol, DMSO, eritritol, etilen glicol, dietilen, trietilen, propilen, polietilen glicol), usados a muchas concentraciones (0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 M) y expuestos a diferentes tiempos de penetración (10, 15 y 30 min) y temperaturas (0°, 10°, 15°, 20°C). En este aspecto, aún restan por hacerse estudios más sistemáticos y completos que indaguen la acción específica de cada sustancia postulada como crioprotector, sea penetrante o no, y que explique sus beneficios y posibles daños. Como nuestro interés

es de tipo más práctico, elegimos entre los crioprotectores que están más accesibles a un laboratorio modesto, como el glicerol y el DMSO, aplicando una mezcla de ellos. Utilizamos la mezcla glicerol-DMSO que penetran (McGann, 1978) pues en nuestro laboratorio había sido ya probada, mostrando ser eficaz en los otros tipos celulares en cultivo estudiados, además de que nuestras pruebas preliminares nos señalaron esta combinación como la adecuada, aunque casi todos los estudios tienden más al uso de un crioprotector puro. Con ello consideramos que se reduciría mucho el fenómeno de recristalización inducido por la congelación rápida (Mazur, 1970), es decir, que los cristales de hielo pequeños se unan para formar espículas, además de bajar el punto eutéctico del sistema celular.

El siguiente aspecto a definir y que constituye la parte medular de nuestro trabajo, fué la implementación de la técnica de congelación y descongelación. Como ya se mencionó en la Introducción, el grupo de Whittingham - que fué quien primero obtuvo embriones de ratón viables después de ser congelados y descongelados (1971) - en sus estudios posteriores (1976 en adelante) una vez que parece haber refinado ya la técnica de congelación y descongelación lenta y propuesto algunas variables con respecto al crioprotector, e incluso cambiado su modelo animal habitual - el ratón -, comienza a buscar que su método sea más eficiente y más rápido, esforzándose por reducir el tiempo de descongelación y estableciendo que a una velocidad de 275° a 500°C por minuto no se observan diferencias en la viabilidad embrionaria, comparada con la viabilidad obtenida descongelando lentamente. Sin embargo, "recomienda" el descongelamiento lento (1979), a diferencia de Kasai y cols. (1980) que recomiendan el descongelamiento rápido.

Nosotros realizamos toda la congelación en 5 minutos , utilizando el método en dos pasos, usado por múltiples autores (Whittingham, Kasai, Iritani, Wood, Farrant) pero lle-

vando los embriones en el primer paso a -76°C , que es la temperatura conferida por la combinación de acetona-hielo seco (Merryman, 1968), que además de estar compuesta por elementos muy accesibles a cualquier laboratorio, nos permitió evitar los " efectos de solución " que son, según los describe Mazur (1970), consecuencia de la disminución lenta de la temperatura : a menor contenido de agua celular, habrá más precipitación de solutos.

El segundo paso, que es llevar los embriones a -196°C , es tá claramente establecido, ya que a esta temperatura el metabolismo se reduce al mínimo pero a un nivel suficiente para mantenerlos vivos.

Aunque el tiempo máximo reportado en el que se han mantenido los embriones viables a -196°C (Whittingham, 1978) es de 4 años, nosotros consideramos que 117 días es un período adecuado para apreciar que la técnica es efectiva.

El dato de tiempo de descongelación, que nos pareció fiable y que no modificamos, por su rápida ejecución, fué el dado por Wood y Farrant (1980).

Finalmente, la forma de detectar la viabilidad presenta algunos aspectos interesantes. Es consenso general que la única forma definitiva de conocer si un embrión es funcional o no, es transplantarlo a una madre adoptiva, sin embargo ésto requiere un dominio muy preciso de la técnica de implantación, la que implica problemas de rechazo inmunológico, infección, pérdida del embrión durante la manipulación, etc., lo cual rebasa en mucho las pretensiones de nuestro estudio.

Por otra parte, también existe la posibilidad de determinar la viabilidad del embrión por el método de cultivo in vitro (ver Introducción), pero en esta fase existe mucha discrepancia en los métodos de diferentes autores, lo cual explica la dificultad de hallar una técnica estándar fiable para el cultivo de embriones de rata. Hay incluso autores que sostienen que los embriones de ratón son los más resistentes al tra

tamiento de congelación y al proceso de cultivo (Miyamoto e Isibashi, 1977, 1978) y que por lo tanto ofrecen mejores índices de viabilidad. Como nosotros consideramos que la rata es uno de los modelos más frecuentes en los laboratorios biomédicos y que sería más útil dirigir nuestros esfuerzos a este modelo, y como no contábamos con tal técnica de cultivo, decidimos descartar esta prueba que en sí implicaba un estudio aparte. Además, Whittingham (1975) con su vasta experiencia en la técnica de congelación, enfatiza que el cultivo de los embriones después del descongelamiento tiene un efecto dañino sobre ellos. Conociendo todo ésto y los reportes de Whittingham (1972, 1976, 1979) y Griffiths (1979) que utilizan como uno de los criterios básicos el morfológico, nosotros lo elegimos también como la forma de discriminar viabilidad.

Ahora bien, tanto la técnica de cultivo in vitro como la de implantación de embriones, son aspectos que aún requieren de mucha dedicación para asignarles validez, esto es, ya no importa si los embriones provienen de un proceso de congelación y descongelación o no, lo que interesa en este aspecto es contar con un método (o métodos) de cultivo y de implantación que aseguren la viabilidad embrionaria, y ésto es tema magnífico de otros estudios; mientras tanto, como nuestro trabajo mira específicamente hacia la técnica de congelación y descongelación, nos hemos limitado a considerar los aspectos básicos que "prometen" viabilidad, tales como la morfología, la ausencia de hielo intracelular y la tinción.

De esta manera, fuimos cubriendo cada paso del método de preservación, basando nuestra elección de entre las varias maneras descritas de efectuar cada fase en una posibilidad que nos pareciera accesible, económica y fiable. Está por demás decir que la ejecución de una técnica con tales características dió por resultado datos discutibles desde diferentes puntos de vista; primero, el hecho de que quisimos observar la

efectividad de la técnica en embriones de diferentes edades, implicó que no pudiéramos coleccionar el mismo número de embrio de distinta edad, por la dificultad quirúrgica. En lo que respecta al criterio morfológico, debemos enfatizar el hecho de que nosotros no consideramos viables a ningún embrión que tuviera uno o más blastómeros dañados, aunque existen autores como Whittingham (1972) que con tan solo la mitad de blastómeros buenos los consideraba embriones viables, ya que al transplantarlos desarrollaban a fetos normales.

Aún con la inconstancia en el número de embriones por cada estadio y en el tiempo durante el que permanecieron congelados, logramos observar porcentajes de viabilidad significativamente diferentes en los tres estadios (ver tablas I y II) . Además, se hizo patente la tendencia a aumentar la viabilidad conforme el estadio era más avanzado en su desarrollo (ver Fig. 6). Este es un punto que llama la atención, pues parecería lógico atribuirle más "resistencia" a los embriones más desarrollados, sin embargo, no hay datos actualmente que refuerzen o contradigan tal suposición ya que la mayoría de los estudios han sido hechos sobre embriones de ratón en el estadio de 8 blastómeros y los pocos de rata también en el mismo estadio. Esta preferencia es justificada, si consideramos la necesidad primordial de perfeccionar primero la técnica, tarea a la que han estado encaminados casi todos los estudios (adecuadas velocidades de congelación, de descongelación, concentraciones de crioprotectores, tiempos de congelación, etc.) , así como a las bases físicoquímicas del proceso. Considerando lo anterior, nos parece poco conveniente comparar nuestros datos de viabilidad con los de otros trabajos de una manera muy estricta y sí de una manera global.

Pensamos que el número total de embriones viables y no viables tiene el suficiente peso como evidencia para apoyar

la eficacia de esta técnica y que los datos son bastante claros.

Ahora bien, nuestra técnica está aún muy de ser perfecta, ya que con estudios precisos que incluyan otras especies de mamíferos, número constante de embriones, otros estadios embrionarios, así como el trasplante de embriones, se comprobaría su real eficacia. De esta forma, se podría entonces intentar abrir esta línea hacia campos tan necesitados de ella, como el área ganadera, el área que maneja especies animales en peligro de extinción, o el área clínica humana.

CONCLUSIONES

En base a nuestros datos se puede deducir lo siguiente :

- a) Es posible implementar una técnica de congelación y descongelación eficaz con sustancias y equipo accesibles a un laboratorio modesto en recursos.
- b) Es posible acortar todavía más, el tiempo de congelación de aquél reportado por otros autores, y ejecutar la maniobra de congelación-descongelación en 5 minutos.
- c) La técnica permite mantener embriones en congelación hasta 117 días .
- d) Existe una correlación entre los criterios morfológicos y por tinción para asignar viabilidad embrionaria.

APENDICE : SOLUCIONES

I Medio de Eagle

Sol. salina de Hanks 200 ml/lit

Suero fetal de ternera 100 ml/lit

Glutamina 0.292 gr/lit

Bicarbonato 0.35 gr/lit

Penicilina 0.888 ml/lit

Aforar a un litro con agua bidestilada

Se ajusta el pH a 7.2

Se esteriliza pasando la solución por un filtro de 0.45 μ m.

II Solución salina de Hanks

NaCl 8.00 gr/lit

KCl 0.40 gr/lit

CaCl₂ 0.14 gr/lit

MgSo₄.7H₂O 0.10 gr/lit

MgCl₂.6H₂O 0.10 gr/lit

Na₂HPO₄.2H₂O 0.06 gr/lit

KH₂PO₄ 0.06 gr/lit

Glucosa 1.00 gr/lit

NaHCO₃ 0.35 gr/lit

Rojo fenol 0.02 gr/lit

III Crioprotector

Glicerol al 7% (7 ml)

DMSO al 3% (3 ml)

Se afora con Eagle a 100 ml

Se regula el pH a 7.2

Se esteriliza pasando la solución por un filtro de 0.45 μ m.

IV Colorante

Azul de tripano 20 mg/100 ml de sol. sal. de Hanks
Se esteriliza pasando la solución por un filtro de 0.22 μm .

V Silicón

1 ml de silicón se disuelve en 100 ml de éter o cloroformo.
El material se cubre homogéneamente con la solución y se
deja secar .

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, G. and R.H. Foote, 1975.
Development of rabbit embryos in vitro and in vivo
following of the two cell stage at 10°C
H. Reprod. Fert. 45: 151-153.
- Griffiths, J.B., C.S. Cox, D.J. Beadle., C.J. Hunt., and
D.S. Reid. 1979
Changes in Cell Size During the Cooling, Warming and
Post-Thawing Periods of the Freeze-Thaw Cycle
Cribiology 16: 141-151
- Daniels, J.C. 1971
Mammalian embryology. W.H. Freeman and Company. San Francis
co, Calif.
- Hunter, F.R. (1970)
Facilitated diffusion in Pigeon
erythrocytes. Am. J. Physiol. 218. (6): 1765-1772
- Kasai, K., K. Niwa and A. Iritani , 1980,
Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly.
J. Reprod. Fert. 59: 51-56.
- Kasai, K., K. Niwa and A. Iritani, 1981
Effects of various cryoprotective agents on survival of
unfrozen on frozen mouse embryos.
J. Reprod. Fert. 63: 175-180
- Leibo, S., P. Mazur and S.C. Jackowski, 1974
Factors affecting survival of mouse embryos during
freezing and thawing
Exp. Cell Res 89: 79-88
- Malinin T.I. and V.P. Perry, 1967
A review of Tissue and organ viability assay
Cribiology 4:3.
- Maurer, R., 1978
Freezing mammalian embryos: Review of techniques
Theriogenology. 2: 45-68
- Mazur, P., 1970
Cribiology: The freezing of biological systems. Science,
168:939-949
- McGann, L.E., 1978
Differing actions of penetrating and nonpenetrating
cryoprotective agents.
Cryobiology. 15: 382-390

- Meryman, H., 1966
Cryobiology; Academic Press. Inc. New York, 2-106
- Meryman, H., 1971
Cryoprotective agents
Cryobiology, 8: 173-183
- Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1977
Survival of frozen thawed mouse and rat embryos in the
Presence of ethylen glicol
J. Reprod. Fert. 50: 373-375
- Miyamoto, H. and T. Ishibashi, 1978
The protective action on glycols againsts freezing
damage of mouse and rat embryos
J. Reprod. Fert. 54: 427-432.
- Montoya, S.R., 1969
Efecto del dimetil sulfóxido en macrófagos cultivados
Recuperación de la actividad celular observada en corto
tiempo.
Tesis Profesional Fac. Ciencias. U.N.A.M.
- Pribor, D.B., 1975
Biological interactions between cell membranes and
glycerol or DMSO. Cryobiology, 12: 309, 320
- Whittingham, D.G., 1972
Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C
Science, N.Y. 178: 411-414
- Whittingham, D.G., 1974
Embryos banks in the future of developmental genetics
Genetics. 78: 395-402
- Whittingham, D.G., 1975
Survival of rat embryos after freezing and thawing
J. Reprod. Fert. 43: 575-578
- Whittingham D.G., 1976
Low temperature preservation of rabbit embryos
J. Reprod. Fert. 47: 269-274
- Whittingham D.G., 1978
Freezing embryos of laboratory species
Cryobiology, 15: 367-369

- Whittingham, D.G., 1979
Survival of frozen mouse embryos after thawing from
-196°C J. Reprod. Fert. 56: 11-21
- Wood M. and J. Farrant, 1980
Preservation of mouse embryos by two step freezing
Crobiology, 17: 178-180