



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia

Crioprotección y Congelación rápida en nitrógeno líquido de embriones de rata de laboratorio

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM

T E S I S
Que para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista
P r e s e n t a

LUZ MARIA CUE MARTINEZ C848



Asesores:

Biól J. Raúl Astiazarán Ybarra
MVZ. Javier Valencia Méndez

México, D. F

1985

1. Embriones - Congelación
2. Embriología experimental



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**CRIOPROTECCION Y CONGELACION RAPIDA EN NITROGENO LIQUIDO DE
EMBRIONES DE RATA DE LABORATORIO.**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista**

por

Luz María Cué Martínez

Asesores:

Biol. José Raúl Astiazarán Ybarra.

M.V.Z. Javier Valencia Méndez.

México, D.F.

1985

A mis Padres y Hermanos, por darme todo y más.

A los compañeros que tienen un sentido social del hacer y de la existencia.

A la Universidad y a mi querida Facultad.

AGRADECIMIENTOS

Con especial gratitud a José Raúl Astiazarán Ybarra por su dedicación en la realización de este trabajo y por sus valiosas enseñanzas.

A Alberto Soto Valle Favela, quien participó activamente y con gran entusiasmo durante todo el trabajo.

A Martín López Valenzuela por su gran ayuda.

A la Dra. Ana Estela Auró de Ocampo por su valiosa y desinteresada colaboración en la realización del análisis estadístico.

A mi tía Herlinda Cedillo por su generosa ayuda.

A mis amigos.

C O N T E N I D O

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	3
II.1 Almacenamiento de Embriones.....	4
II.2 Aplicaciones Prácticas de la Congelación.....	5
II.3 Aspectos Básicos de la Congelación.....	6
II.3.1 Características embrionarias.....	8
II.3.2 Crioprotección embrionaria.....	10
II.3.3 Ritmos de enfriamiento.....	13
II.3.4 Ritmos de descongelamiento.....	15
II.3.5 Eliminación del crioprotector.....	16
II.3.6 Hipótesis y Objetivos.....	19
III. MATERIAL Y METODOS.....	20
III.1 Obtención de Embriones.....	20
III.2 Medios y Soluciones.....	21
III.3 Crioprotección de Embriones.....	22
III.4 Congelamiento de Embriones.....	22
III.5 Transferencia de Embriones.....	23
III.6 Registro Fotográfico.....	24
IV. RESULTADOS.....	28
IV.1 Crioprotección de Embriones.....	28
IV.2 Congelamiento de Embriones.....	29
V. DISCUSION.....	36
VI. LITERATURA CITADA.....	40

I. R E S U M E N

CUE MARTINEZ, LUZ MARIA. CRIOPROTECCION Y CONGELACION RAPIDA EN NITROGENO LIQUIDO DE EMBRIONES DE RATA DE LABORATORIO. (bajo la dirección de: J. Raúl Astiazarán Ybarra y Javier Valencia Méndez).

La congelación en nitrógeno líquido es una técnica que ofrece la posibilidad de almacenar los embriones por tiempo indefinido, representando así una importante herramienta en los programas de transferencia de embriones en los animales domésticos. Por esta razón, esta técnica ha sido ampliamente estudiada, con embriones de animales de laboratorio, para simplificarla y permitir su difusión a nivel de campo. Los objetivos del presente trabajo fueron: a) estudiar diferentes concentraciones de crioprotectores (Glicerol y Sacarosa) en embriones de rata (Rattus norvergicus, variedad Wistar), en estadio de mórula y blastocisto para observar si estas modifican la morfología y la viabilidad in vivo de los embriones, sin ser sometidos a congelamiento; y b) congelar los embriones directamente en nitrógeno líquido, sin ningún enfriamiento previo, utilizando la concentración del crioprotector más adecuada, obtenida de los resultados del inciso anterior, y observar si tal procedimiento afecta la morfología y la viabilidad in vivo de los embriones. Aproximadamente el 90% de los embriones, en ambos estadios, se recuperaron morfológicamente en el laboratorio, después del tratamiento de crioprotección con los diferentes medios. Cuando se transfirieron 57 blastocistos tratados con PBS + 1.5M Glicerol + 0.125M Sacarosa en el medio de crioprotección y PBS + 1.5M Sacarosa en el medio de dilución, solo se desarrolló el 35% in vivo, lo cual es significativamente menor al porcentaje obtenido con blastocistos

no tratados (55%). Cuando se congelaron en nitrógeno líquido, 100 embriones en la etapa de mórula, el 59% mostró una buena morfología después del descongelamiento y cultivo en el laboratorio; sin embargo, cuando se transfirieron a hembras receptoras, solo el 7.5% se desarrolló en fetos. Con estudios encaminados en un futuro a perfeccionar esta técnica, se podrá llegar a simplificar los métodos de congelamiento actuales.

II. I N T R O D U C C I O N

El mejoramiento genético de los animales domésticos, representa una de las mayores posibilidades para generar beneficio en la producción animal. Por ello, el estudio de nuevos sistemas y técnicas que faciliten su aplicación práctica en cualquier sistema de explotación, para mejorar la eficiencia de la producción ganadera, es un reto para los investigadores y profesionales del área, y será más importante conforme el tiempo pase y la población humana se incremente y demande mayor cantidad y calidad de alimento de origen animal (15).

Actualmente, la técnica que ha permitido el aprovechamiento de progenitores con características zootécnicas superiores a la mayoría de los de su especie, es la Inseminación Artificial; consolidándose, hasta la fecha, como el mayor éxito en la aplicación de tecnología a la industria de la producción animal y por ende, como una práctica rutinaria en los programas reproductivos de algunas especies domésticas, principalmente ganado bovino lechero, y especialmente en países desarrollados (12).

Una de las claves del éxito de la Inseminación Artificial, que ha permitido aprovechar sus ventajas, es la posibilidad de utilizar semen congelado; facilitando su transporte y distribución por todo el mundo (12,28).

Otra alternativa disponible para incrementar la eficiencia reproductiva de las especies domésticas y con la cuál se extiende el uso de hembras genéticamente superiores, es la Transferencia de Embriones; la cuál

representa el desarrollo tecnológico más significativo en la biología de la reproducción en los últimos diez años (28,35,36,50). Con ésta técnica, el potencial reproductivo de una hembra puede aumentar considerablemente, ya que si se le permite, en forma repetida, estar temporalmente preñada (hembra donadora o madre genética), y se recuperan los embriones los primeros 8 días de la gestación transfiriéndolos a otras hembras (hembras receptoras o madres hospedadoras) para que la completen, el número de crías obtenidas será mayor. Además de la transferencia en sí, este proceso involucra también la superovulación de la donadora, la sincronización de las receptoras, la recuperación y el almacenaje de los embriones in vitro (35,36).

Es así como la Transferencia de embriones puede considerarse como "un proceso equivalente a la Inseminación artificial, que permite el aprovechamiento de genotipos femeninos ventajosos, obteniéndose más descendencia del mismo donante genético que la que se obtendría en condiciones normales de reproducción" (12); y aún conseguir mayores beneficios si las dos técnicas se utilizan conjuntamente en los programas reproductivos (50).

Sin embargo, una seria limitante para la optimización del material biológico obtenido durante los programas de Transferencia de embriones, es la falta de un método de almacenamiento práctico que los conserve por tiempo indefinido como ocurre con la técnica de congelación de semen (28).

II.1 Almacenamiento de Embriones

Para manejos experimentales y almacenamiento entre recolección y

transferencia, los embriones por lo general se mantienen en un medio de cultivo a 37°C; aunque en la práctica se mantienen con éxito durante varias horas a temperatura ambiente (15° a 25°C) (36).

Si los embriones son refrigerados entre 0° y 10°C o se transfieren al oviducto ligado de una coneja (36) o al cuerno uterino de una rata ovariectomizada (1), pueden almacenarse por varios días con poca reducción de su viabilidad.

El almacenamiento de embriones a temperaturas cercanas a los 0°C es de limitada duración en cuanto a viabilidad de estos se refiere, debido a la inestabilidad de algunos componentes celulares, especialmente las enzimas (46). No obstante, recientemente se ha demostrado que los embriones de bovino pueden ser refrigerados hasta por tres días a 4°C sin pérdidas significativas en su viabilidad, permitiendo esto una mayor sincronización entre donadora y receptora, y aún llevar a cabo su transporte (24).

A pesar de esto, el método de almacenaje que permite la conservación de los embriones a largo plazo es la Congelación en nitrógeno líquido; la cuál ofrece numerosas ventajas (21,28,35,47,50).

II.2 Aplicaciones Prácticas de la Congelación

Las aplicaciones prácticas que el almacenamiento de embriones por congelación ofrece a la Transferencia de embriones de animales domésticos, son:

- a) La conservación del potencial genético de animales valiosos aún

(1) Astiazarán, R. Comunicación personal 1985.

después de su muerte, creándose bancos embrionarios (6,12,21,28,47,50).

b) La facilidad de transportar los embriones permitiendo su exportación e importación, abriéndose un mercado internacional, para mejorar el rendimiento ganadero en países en vías de desarrollo, ya que evidentemente, esto resulta más barato y cómodo que el transporte de ganado en pie (6,12,28,47).

c) El uso más eficiente de hembras receptoras en los programas de Transferencia de embriones porque facilitaría la sincronización entre el estadio embrionario y el desarrollo endometrial, lo cuál reduce los costos (6,12,28,47).

d) La posibilidad de acortar el tiempo para las pruebas de proge--nie (47,50).

e) El mantenimiento de controles genéticos, permitiendo evaluar el progreso de los experimentos de selección al cabo de muchos años (12,21,47).

Actualmente, el principal inconveniente de esta técnica es que se requiere de equipo y metodologías costosas para llevarla a cabo, lo cuál ha limitado su desarrollo de manera extensiva (35).

II.3 Aspectos Básicos de la Congelación

Se ha reportado en la literatura que los factores causantes del daño durante el congelamiento y descongelamiento de los sistemas vivientes, son el flujo de agua a través de su membrana celular y la formación de hielo intracelular (20,28,33). Así, el agua tiende a fluir hacia el exterior de las células como respuesta a las concentraciones crecientes de soluto al congelarse el medio externo, produciendo la deshidratación de éstas y su encogimiento. Este movimiento de agua incrementa la concen--

tración interna de solutos produciendo "efectos de solución", que reducen la viabilidad de las células, debido a la modificación de la estructura tridimensional de las proteínas o su precipitación en solución (20, 33,49). Por otro lado, los efectos dañinos del hielo intracelular pueden resultar, ya sea por la acción directa durante su formación y recristalización en el calentamiento, o por el stress osmótico impuesto a las células una vez que el hielo se ha derretido (49).

Por lo anterior, se puede afirmar, que la deshidratación y rehidratación de las células, son los principales eventos involucrados durante el proceso de congelamiento; y por lo tanto, la sobrevivencia de los embriones estará íntimamente relacionada con la remoción de agua intracelular para evitar la formación de hielo y un choque osmótico durante el descongelado (18).

Todos estos eventos pueden ser controlados si se toman en cuenta varios factores fundamentales que influyen directamente en el éxito del proceso de Congelación:

- A) Características embrionarias
- B) Crioprotección embrionaria
- C) Ritmos de enfriamiento
- D) Ritmos de descongelamiento
- E) Eliminación del crioprotector

Estos factores han sido materia de estudio y experimentación para muchos investigadores dedicados a la Criobiología de embriones, con el propósito de crear métodos de congelación sencillos y aplicables a las

condiciones prácticas de campo (22).

Es importante indicar que todos los avances obtenidos en las técnicas de congelación y en general en la industria de la Transferencia de embriones, se ha fundamentado principalmente en la investigación básica realizada con animales de laboratorio, ya que estos presentan ventajas importantes como serían: a) el poder mantenerlos en espacios reducidos; b) sus respuestas satisfactorias a los tratamientos de superovulación; c) la facilidad de llevar a cabo experimentos con significancia estadística por poseer intervalos generacionales cortos; d) la obtención de gran número de embriones por ser especies politocas, y e) lo económico que cada uno de estos incisos representa (7,11).

A pesar de lo anterior, debe señalarse que probablemente el potencial económico de éstas técnicas sea su aplicación en el ganado bovino y otras especies domésticas; para lo cual, deberán desarrollarse experimentos de validación para poder extrapolar los conocimientos obtenidos en los embriones de animales de laboratorio a los de éstas especies (7,10, 11).

II.3.1. Características embrionarias

Para la selección de los embriones que serán sometidos a congelación, deben considerarse dos aspectos importantes: el estadio y la calidad embrionaria.

Los primeros trabajos exitosos en congelación de embriones se desarrollaron primeramente en embriones de ratón (43), lo que hizo pensar

que esa metodología sería semejante para los embriones de otras especies. Sin embargo, Bank y Maurer (1) encontraron que los embriones de conejo de 8 células no sobrevivieron al stress del congelamiento siguiendo el mismo patrón, apareciendo más sensibles a los cambios osmóticos durante el descongelado. En estadio de mórula los embriones de conejo lograron desarrollarse a fetos viables después de transferirlos (27). Elsdén et al. (8), reportaron que los embriones de bovino en estadio de mórula no toleraban el congelamiento y descongelamiento como los blastocistos. Esto hace pensar que aún en embriones de la misma especie, la etapa de desarrollo embrionario presenta diferentes respuestas a la congelación.

Contrariamente a esto, Bui-Xuan-Nguyen (6) no encontró diferencias entre mórulas y blastocistos de bovino en cuanto a porcentaje de sobrevivencia in vitro. Tampoco se observan diferencias entre la sobrevivencia de embriones de conejo de 4 y 8 células y mórulas después de descongelados, en los estudios realizados por Wittingham (45). Igualmente, una alta proporción de embriones de ratón y rata desde la etapa de ovocito hasta blastocisto han permanecido viables después de congelados (28). Sin embargo, las etapas de mórulas tardías y blastocistos tempranos de embriones de conejo y bovino sobreviven mejor el stress del congelamiento que etapas anteriores (18,28).

Los embriones de bovino, y quizá en los de otras especies, la compactación y blastulación permiten una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, por lo que los trabajos de congelación se llevan a cabo en los estadios de mórulas y blastocistos tempranos (18).

En el congelamiento de blastocistos expandidos y elongados no se han obtenido resultados favorables (16,18).

Los resultados obtenidos hasta ahora con los procesos de congelación dependen en algún grado del estadio embrionario, pero la "calidad" del embrión es igualmente importante, ya que se ha observado que los embriones clasificados como de buena morfología, poseen mayores posibilidades de sobrevivencia que aquellos que sufren de alguna alteración (18). Lo anterior ha sido señalado de igual manera por otros autores (8,40,52).

Elsden et. al. (8), evaluaron los embriones obtenidos calificándolos de 1 a 5, correspondiendo a los siguientes grupos: excelente, buenos, regulares, pobres y degenerados. Solamente los embriones de las categorías 1 y 2 fueron congelados.

El número de blastómeros que conforman al embrión es importante para que éste pueda sobrevivir después de un tratamiento de congelación, ya que se ha encontrado que blastocistos a los cuáles se les ha reducido la mitad o tres cuartas partes de su número celular, degeneran después del tratamiento (18).

II.3.2. Crioprotección embrionaria

Para que los embriones de mamíferos puedan sobrevivir a los daños producidos por el congelamiento, es indispensable incorporar en el medio de congelación, sustancias protectoras (crioprotectores), ya que en ausencia de estos, es imposible que los embriones sobrevivan más allá de -20°C (28,34).

Se han utilizado diversas sustancias para proteger a los embriones durante el congelamiento, las cuáles tienen como función deshidratar a las células embrionarias, disminuir el punto de congelamiento intracelular y moderar los cambios en la concentración de solutos celulares (28).

La forma en que cada sustancia lleva a cabo su actividad protectora dependerá de su capacidad para atravesar la membrana celular. Así tenemos dos grupos: crioprotectores permeables o intracelulares, como el Dimetilsulfóxido (DMSO), Glicerol, Etilenglicol, Propanediol y Metanol (8, 28,32,33,34); y crioprotectores impermeables o extracelulares, como la Sacarosa y la Polivinilpirrolidona (PVP) (28).

Cuando los embriones son expuestos a un crioprotector permeable, éstos sufren una pérdida de agua debida a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular. Esta deshidratación continúa hasta que la salida de agua es balanceada por la entrada del crioprotector que la sustituye (34).

Los crioprotectores extracelulares permiten la salida de agua por el mismo mecanismo, sin embargo, no penetran a la célula. Estos se han utilizado con éxito, en el congelamiento de embriones hasta temperaturas de -79°C (42,54). Actualmente, la sacarosa se está utilizando en combinación con crioprotectores permeables, principalmente el glicerol, para permitir una mayor deshidratación (6,33).

El DMSO fué el crioprotector utilizado en los primeros trabajos de congelación de embriones; sin embargo, a partir de que Leibo y Mazur (19)

utilizaron con éxito el glicerol, ambos han sido los crioprotectores más comunes, hasta la fecha.

El procedimiento de adición del crioprotector consiste en ir aumentando gradualmente la concentración de éste, hasta alcanzar la molaridad final deseada, lo cuál requiere aproximadamente de 30 a 50 minutos. Este procedimiento impide que los embriones sufran una deshidratación brusca, ya que permite un equilibrio entre la presión osmótica intra y extracelular durante los cambios de concentración crecientes de la sustancia protectora (28). Sin embargo, recientemente se ha visto, que el procedimiento de adición anterior puede ser sustituido por la adición en un solo paso, sin que se produzcan efectos dañinos en el embrión, lo cuál ha simplificado enormemente este proceso (34).

Comparando el DMSO y el glicerol para la congelación de embriones de bovino, se encontró que este último daba mejores resultados cuando se emplearon en concentraciones similares (1.5M) (5).

Al comparar la eficiencia entre diversos crioprotectores en un trabajo de congelamiento de embriones de bovino, no se observaron diferencias significativas cuando se emplearon etilenglicol al 1.5M, DMSO + glicerol al 1.25M, y glicerol al 1.33M. No obstante, los mejores resultados fueron obtenidos con glicerol (8). Sin embargo, en un trabajo realizado por Takeda et. al. (37), observaron que el DMSO permitía la sobrevivencia de embriones de ratón en mayor grado.

Las diferencias observadas en la viabilidad de los embriones de las

distintas especies al emplear los mismos crioprotectores y concentración, es debida probablemente a la permeabilidad de sus membranas (34).

II.3.3. Ritmos de enfriamiento

En base a los conocimientos obtenidos sobre los daños producidos en las células por el congelamiento, los primeros trabajos sobre congelación de embriones se basaron en ritmos de descenso de temperatura que fueran lo suficientemente lentos para permitir una deshidratación osmótica, que previniera la formación de hielo intracelular, pero lo suficientemente rápidos para minimizar la exposición celular a la alta concentración de solutos (28). Apoyados en esto, Wittingham (43) en 1972, y posteriormente otros investigadores, logran obtener crías a partir de la congelación en nitrógeno líquido de embriones de ratón (19,26,44,54), rata (46), conejo (1,27,45,48), oveja (51), cabra (3), y vaca (52,55).

En los trabajos anteriores, los ritmos de disminución de temperatura fueron de 0.1° a $2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ hasta la temperatura de -65° , -80° ó -100°C , para posteriormente sumergir directamente los embriones en nitrógeno líquido.

Posteriormente, en estudios desarrollados en embriones de ovinos, bovinos y ratones (3,49), se observó que no era necesario descender los ritmos de temperatura hasta -65° ó -100°C antes de sumergirlos directamente en el nitrógeno, sino que era posible realizar lo anterior entre -30° y -40°C , siempre y cuando el descongelamiento se llevara a cabo en forma rápida ($360^{\circ}\text{C}/\text{min.}$). De esta manera, las células, en el momento

de su congelamiento poseen en su interior, una pequeña cantidad de hielo que no daña su viabilidad (49). Este procedimiento es conocido como método "Rápido" de congelamiento, y ha sido estudiado por diversos autores (8,9,16,17,39).

Más tarde, se desarrolló el procedimiento de "Dos pasos" (13,56), el cuál ha sido comparado recientemente con los métodos de congelamiento "Rápido", no encontrándose diferencias significativas en las tasas de sobrevivencia (4,5,6). La técnica original, llevada a cabo con embriones murinos, consiste en que después de la cristalización a -9°C , las muestras pasan directamente a -20°C , y posteriormente a -100°C permaneciendo en ambas temperaturas por 10 min., para ser sumergidos inmediatamente después al nitrógeno líquido. Las modificaciones más recientes a ésta técnica se han hecho con embriones de bovino y conejo, y consisten en colocar las muestras, después de haber inducido su cristalización a -7°C , directamente a -30°C en donde permanecen 30 min. antes de ser sumergidas al nitrógeno (4,5). Otros autores han abreviado aún más este procedimiento ya que han eliminado el paso de la cristalización, aunque se requiere de la utilización de crioprotectores combinados (6,33,40).

En los últimos dos años se han logrado notables avances en cuanto a los ritmos rápidos de congelamiento. Así lo demuestran Takeda (38) y Krag (14) que reportan haber obtenido desarrollos embrionarios a partir del congelamiento de embriones de ratón, directamente en nitrógeno líquido, es decir, llevando los embriones de temperatura ambiente hasta -196°C sin ningún enfriamiento previo. Otro método de congelamiento consiste someter a los embriones de ratón, de temperatura ambiente a vapores de

nitrógeno (-100°C) durante 2 min., antes de ser sumergidos en el nitrógeno líquido. Empleando esta técnica, Williams (53) obtuvo desarrollos em brionarios y algunos fetos aislados.

Actualmente, la forma comercial de embriones se lleva a cabo median te el método Rápido, con la utilización de congeladoras automáticas que permiten programar el ritmo de descenso y ascenso de la temperatura. Sin embargo, las últimas técnicas de congelamiento podrian ofrecer una alternativa a los actuales métodos de congelación y permitir su difusión a nivel práctico, ya que se obtendrían importantes ahorros de tiempo y equipo.

II.3.4. Ritmos de descongelamiento

Como ya se mencionó anteriormente, los ritmos lentos de enfriamien- to, permiten una deshidratación de las células que impide la formación de hielo intracelular; debido a esto, los ritmos de descongelamiento len to producen una buena recuperación embrionaria ya que no hay riesgo de recristalización, lo cuál no ocurre con el descongelamiento rápido (49). Esto justifica que los trabajos anteriores de congelación de embriones reportaran ritmos lentos de ascenso de temperatura que iban de 4° a 25°C por min., de -70° a -10°C con resultados positivos de sobrevivencia em- brionaria.

Investigaciones posteriores demostraron que era factible el descon- gelamiento rápido (275° - $500^{\circ}\text{C}/\text{min.}$), si el enfriamiento lento se termina ba entre -30° y -40°C (31,49), ya que a esa temperatura no existe una completa deshidratación y hay formación de hielo intracelular, que fun--

ciona, en este caso, protegiendo al embrión contra el descongelado rápido, porque previene los daños osmóticos al impedir el movimiento de agua a través de la membrana celular y limita el tiempo de exposición a las fluctuaciones de concentración de solutos (49).

A partir de entonces, la mayoría de los trabajos de congelación permiten realizar un descongelamiento rápido, como lo es colocar las muestras, ya sea directamente a temperatura ambiente (13,22), o en baño maría a diferentes temperaturas (20° , 25° , 30° , ó 37°C), lo cuál permite que el ascenso de temperatura sea de $1200^{\circ}\text{C}/\text{min}$. aproximadamente.

Al comparar los resultados obtenidos durante el descongelamiento de embriones de bovino en baño maría a 37° y 25°C , se observó que el primero producía un mayor porcentaje de recuperación embrionaria y de preñez (8). Schneider (34), recomienda usar el baño maría a 20°C para el descongelamiento de pajillas y a 37°C para el de ampollitas, con el objeto de compensar las diferencias en la superficie del volumen de los envases.

II.3.5. Eliminación del crioprotector

El siguiente paso, después de que los embriones han sido descongelados, consiste en eliminar el crioprotector de las células, ya que éste es sumamente tóxico (34).

Como ocurre con la adición del crioprotector, la eliminación de éste va a producir cambios osmóticos en las células. Por ello, si este procedimiento se lleva a cabo inapropiadamente, la viabilidad de las células se verá afectada y el embrión tenderá a degenerarse (34).

Existe una clara evidencia de que el ritmo de remoción del crioprotector es muy importante, ya que si los embriones son transferidos directamente a una solución isotónica, estos se expanden y desintegran por la rápida entrada de agua que ocurrirá para equilibrar la concentración intracelular del crioprotector (34).

El método estandar para evitar ese choque osmótico, es remover el crioprotector gradualmente mediante la adición "por pasos" de solución salina o trasladando a los embriones dentro de soluciones fisiológicas que contienen concentraciones decrecientes del crioprotector (21,22,32, 34). La mayoría de los trabajos reportan que este procedimiento requiere de 6 a 8 pasos de 5 a 10 min. cada uno; lo que significa la inversión de 45 a 90 min. y la utilización de un microscopio que permite observar la morfología de los embriones (22).

La alternativa a esta forma de dilución del crioprotector, es un procedimiento directo que consiste en adicionar al medio de dilución, una concentración hipertónica de un soluto no permeable como la sacarosa, que actúa como una contrafuerza osmótica que impide el movimiento de agua a través de las membranas y facilita la salida del crioprotector. Lo que ocurre es que la sacarosa mantiene una osmolaridad externa constante que impide que los embriones sufran una entrada neta de agua, permitiendo que el protector intracelular difunda fuera del embrión. Con este método se ahorra el tiempo que los embriones permanecerían en contacto con el crioprotector, que como ya se dijo anteriormente, es sumamente tóxico para éstos. Este procedimiento requiere de solo 10 min. y no es necesario el microscopio u otro equipo de laboratorio. Los embriones pueden

colocarse, inmediatamente después, en un medio isotónico o transferirse directamente dentro del útero de la receptora (22,29,32,34).

Cuando se comparó esta forma de eliminación directa con la dilución en pasos, en embriones de ratón (13) y de bovino (2,30), se reportaron mejores porcentajes de desarrollo embrionario cuando se utilizó el primer procedimiento. Sin embargo Takeda (39), no encontró diferencias significativas entre los dos procedimientos al emplear embriones de bovino.

Con el éxito del método de dilución con sacarosa se ha desarrollado ultimamente una técnica de congelación de embriones que permite incluir dentro del mismo recipiente, tanto el medio de dilución como el de crioprotección. Para ello se han utilizado pajillas, que además han permitido la Transferencia no-quirúrgica bajo condiciones similares a las usadas en Inseminación artificial (22,23,29).

Otra posibilidad que podría eliminar el manejo de los embriones después de descongelados, podría ser el uso de un crioprotector que no requiera dilución, como lo menciona Rall et. al. (32), quien utilizando Metanol, obtuvo hasta un 81% de desarrollos fetales cuando se transfirieron mórulas de ratón inmediatamente después de descongelados, sin diluir el crioprotector.

II.3.6. Hipotesis y Objetivos

H I P O T E S I S

Si la incorporación del crioprotector por los embriones se desarrolla de manera adecuada, entonces el daño producido por los cristales de hielo intracelular formados por los ritmos rápidos de disminución de temperatura se evitará debido a la apropiada deshidratación de los embriones, por lo que se podrán congelar directamente en nitrógeno líquido y obtener así embriones cuya viabilidad morfológica no sea modificada.

O B J E T I V O S

Con el propósito de simplificar las técnicas de congelación de embriones, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar diferentes concentraciones del crioprotector para observar si estas modifican la morfología y la viabilidad in vivo de los embriones, sin ser sometidos a congelamiento.

2. Congelar los embriones directamente en nitrógeno líquido, sin ningún enfriamiento previo, utilizando la concentración del crioprotector más adecuada, obtenida de los resultados del inciso anterior, y observar si tal procedimiento afecta la morfología y la viabilidad in vivo de los embriones.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1 Obtención de Embriones

Los embriones utilizados en el presente trabajo se obtuvieron de ratas Wistar de 3 a 4 meses de edad, a las cuáles, después de detectarlas en estro mediante citología exfoliativa a partir de un frotis vaginal, se colocaron en jaulas con machos fértiles en una relación 1:1, confir--mándose la cópula un día después, por medio de la presencia de tapón vaginal c de espermatozoides.

Los estadios embrionarios utilizados fueron el de Mórula y Blasto--cisto, los cuáles se colectaron en el cuarto y quinto día respectivamen--te. El sacrificio de las donadoras se llevó a cabo por dislocación cer--vical, para posteriormente incidir en forma de "V" en la región ventral, previa desinfección con una solución diluída (1:100) de cloruro de ben--zalconio, y exponer el aparato reproductor.

La colecta de los embriones se llevó a cabo de la siguiente forma: Se disecó el oviducto junto con el útero y se sumergió en una solución salina estéril. Se perfundió el órgano a través de la región fímbrica utilizando una aguja del no. 27 y pinzas de relojero. Para lograr per--fundir completamente el órgano se requieren 2 ml. de medio. El líquido de perfusión se colectó en vidrios de reloj para su posterior observación al microscopio.

Todos los embriones colectados se lavaron 2 veces en medio fresco, con el objeto de eliminar los restos celulares que los acompañan. Las

operaciones de colecta y traslado de embriones se realizaron utilizando una pipeta Pasteur cuya punta poseía un diámetro aproximado de 150 μ m, con la finalidad de coleccionar el mínimo medio posible junto con los embrines. Unicamente los embriones considerados morfológicamente normales fueron sometidos a los tratamientos experimentales. Todo el material de vidrio fué siliconizado previamente, empleando una solución acuosa de silicon al 1%.

II.2 Medios y Soluciones

Los medios y soluciones utilizados en el presente trabajo fueron:

A) Medio de colecta, cultivo y transferencia de embriones.- Solución fosfatada de Dulbecco (PBS) suplementada con: glucosa 1 g/lt; piruvato de sodio 0.028 g/lt; penicilina 100 U.I./ml y suero de ternera al 10%.

B) Medios de crioprotección y dilución.- La composición de los tres medios de crioprotección y dilución que se utilizaron en el presente trabajo, se encuentran descritos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de los medios de crioprotección y dilución.

	Medio de crioprotección (')	Medio de dilución (')
Medio 1	PBS + 3M Glicerol + 0.25M Saca <u>rosa</u>	PBS + 0.25M Sacarosa
Medio 2	PBS + 2M Glicerol + 0.25M Saca <u>rosa</u>	PBS + 0.25M Sacarosa
Medio 3	PBS + 1.5M Glicerol + 0.125M Sacarosa	PBS + 1.5M Sacarosa

(') La solución PBS que se encuentra formando parte de los medios de crioprotección y dilución, es la misma que se encuentra descrita en el inciso "A".

III.3 Crioprotección de Embriones

Los estadios que se utilizaron para el tratamiento de crioprotección sin congelamiento fueron el de mórula y blastocisto, empleando un total de 80 embriones para cada uno. El total de embriones de cada estadio se dividió en tres grupos de 27 embriones cada uno, para ser sometidos a los diferentes medios de crioprotección y dilución (ver cuadro 1).

La forma en que se adicionó y eliminó el crioprotector de los embriones fué la siguiente:

Los embriones fueron colocados en tubos de ensaye donde se les adicionó el crioprotector en dos etapas de 10 min. cada una. Posteriormente, se inició el proceso de dilución o eliminación del crioprotector, el cuál se logró trasladando a los embriones a una solución de sacarosa durante 10 min. La concentración de los medios de crioprotección y dilución utilizados, se encuentran descritos en el cuadro 1.

Después de terminado el tratamiento, los embriones se lavaron 3 veces en solución salina estéril (PBS) y se cultivaron a 37°C durante 4 horas con el fin de observar su recuperación.

Con el objetivo de determinar la influencia de la crioprotección sobre la viabilidad in vivo de los embriones, se trataron con el medio 3 de congelamiento (ver cuadro 1) 60 blastocistos, los cuáles se transfirieron posteriormente a 7 hembras pseudogestantes.

III.4 Congelamiento Embrionario

Cien embriones en el estadio de mórula, se congelaron directamente en nitrógeno líquido previamente tratados con el medio de crioprotección 2 (ver cuadro 1). El sistema de congelación que se utilizó fué el de pajilla descrito por Leibo (22), y consiste basicamente en incluir en el interior del recipiente, tanto los embriones con el medio de crioprotección, como el medio de dilución (ver figuras 1 y 2-A). Este sistema se cierra herméticamente antes de introducirlo al interior del tanque de nitrógeno líquido en donde permanece almacenado, en este caso por 30 días (ver figura 2).

El descongelamiento de las pajillas se realizó en agua corriente (15°-18°C) (ver figura 3-A). Inmediatamente después se agitaron con la finalidad de que el medio de dilución se combinara con el de crioprotección (ver figura 3-C). Posteriormente, se abrieron los capilares por sus extremos y el contenido se vertió a una caja de Petri que previamente contenía solución PBS estéril (ver figura 3-D). Con la finalidad de eliminar los residuos de los medios de crioprotección en el embrión, estos se lavaron tres veces en PBS para después efectuar la evaluación morfológica de éstos. A lo largo de la metodología anterior se realizó un registro fotográfico.

Los embriones cuya morfología no se vió alterada por el tratamiento, se transfirieron a hembras receptoras con la finalidad de observar la presencia de desarrollos fetales después de 12 días.

III.5 Transferencia de Embriones

La transferencia de embriones se efectuó en hembras receptoras en

el quinto día de pseudogestación, lo cuál se obtuvo colocando a éstas con machos vasectomizados.

La transferencia se realizó de la siguiente manera: se anestesia a la receptora mediante la inhalación de vapores de éter para poder realizar una pequeña insición en su región mediolateral (flanco) y exponer el cuerno uterino. Una vez expuesto éste, con la ayuda de una aguja, se punciona en su extremo anterior, cerca de la unión útero-tubárica, y se introduce la punta de la pipeta de transferencia cuyo diámetro interno es de aproximadamente 150 μ m. En 1 μ l. de medio se transfirieron 4 embriones por cuerno uterino. Por último, se procede a introducir el órgano a la cavidad abdominal y a efectuar la sutura por planos.

III.6 Registro Fotográfico

El registro fotográfico de los embriones se llevó a cabo empleando un microscopio de contraste de fases con cámara integrada (') y película para impresiones en blanco y negro ('').

(') Olympus, Tokyo

('') Kodak, Panatomic-X, FX-135, asa 32



- A. Burbuja de aire
- B. Medio de crioprotección
- C. Medio de dilución

Figura 1. Disposición de los medios de crioprotección y dilución en el capilar de congelamiento.

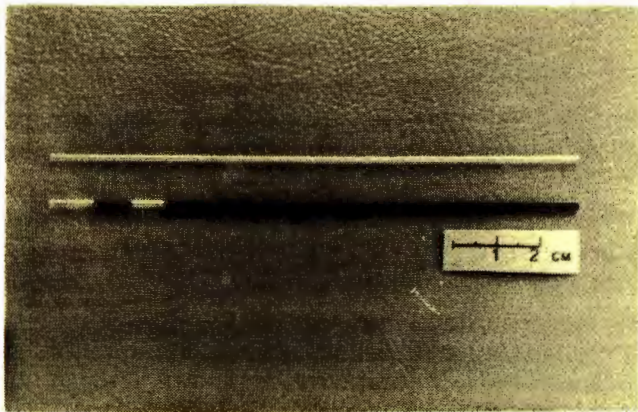


Fig. 2-a

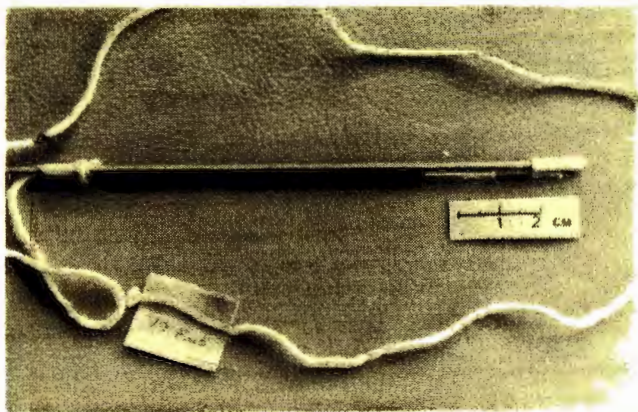


Fig. 2-B



Fig. 2-C



Fig. 2-D

Figura 2. Forma de congelamiento de los embriones de rata

Fig. 2-A. Disposición de los medios de congelación dentro del capilar. La parte clara (izq.) representa el medio de crioprotección que contiene los embriones, y la parte oscura (der.) el medio de dilución; ambos separados por un espacio de aire.

Fig. 2-B. Forma en que son colocados los capilares para facilitar su manejo dentro del tanque de nitrógeno.

Fig. 2-C. Momento en que se introduce todo el sistema dentro de un termo ca sero de 500 ml de capacidad, que contiene nitrógeno líquido.

Fig. 2-D. Tanque de nitrógeno líquido de 10 lt de capacidad, utilizado para el almacenamiento de los embriones.



Fig. 3-A

Fig. 3-A. El descongelamiento se realizó colocando los capilares en agua corriente a temperatura ambiente (18°C).

Fig. 3-B. Este es uno de los problemas que se pueden presentar al descongelar los capilares.

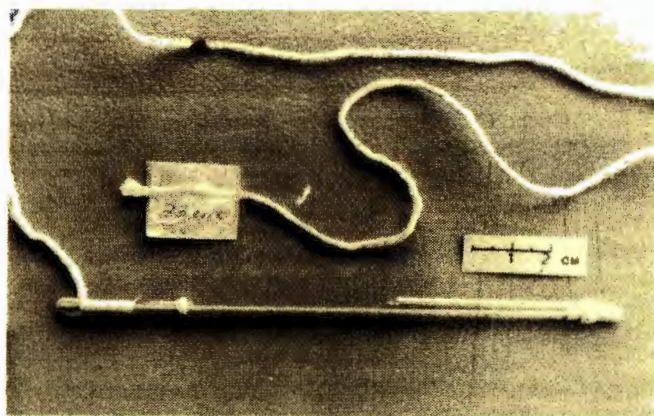


Fig. 3-B

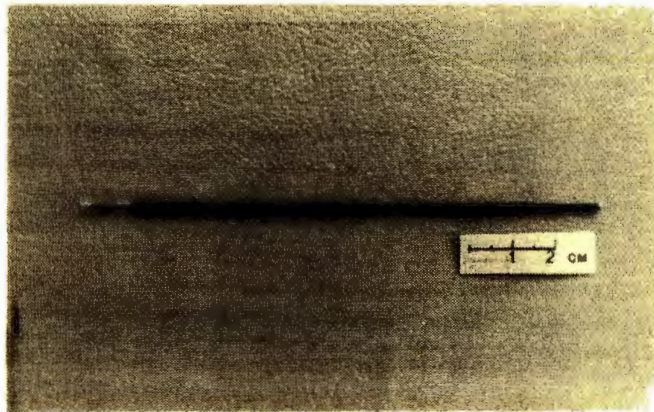


Fig. 3-C

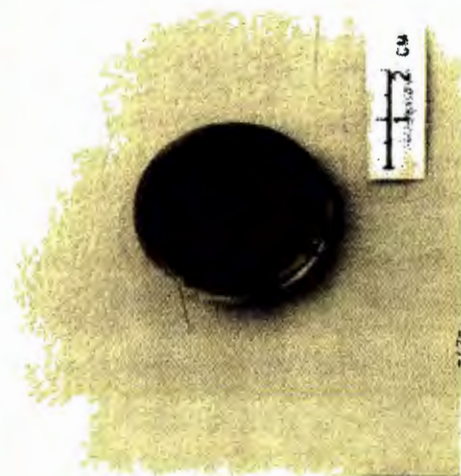


Fig. 3-D

Fig. 3-C. Después del descongelamiento, se agita el capilar para mezclar el medio de dilución con el de crioprotección.

Fig. 3-D. Al final del tratamiento, los embriones se depositan en una solución fisiológica para su evaluación y recuperación.

Figura 3. Forma de descongelamiento de los embriones de rata.

IV. R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se agrupan en los siguientes dos incisos:

IV.1 Crioprotección de Embriones

El índice de recuperación morfológica de los embriones en los estadios de mórula y blastocisto, después de que fueron sujetos al tratamiento de deshidratación, empleando los diversos medios de crioprotección y dilución sin congelamiento, se encuentran descritos en el cuadro 2. De estos resultados se observa que existe de 91% a 100% de recuperación global de los embriones, en ambos estadios, después de que fueron cultivados a 37°C por 4 horas. Al analizar los resultados anteriores, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de embriones recuperados morfológicamente y el medio de crioprotección y dilución empleado ($P > 0.75$ para mórulas y $P > 0.95$ para blastocistos).

El porcentaje de colapsación de los blastocistos tratados con los diferentes medios de crioprotección y dilución, fué ligeramente mayor al emplearse los medio 1 y 3 en comparación con el medio 2 (11.11% y 3.7% respectivamente). Cuando se colocaron los embriones colapsados en medio de cultivo a 37°C por 4 horas, estos restablecieron su cavidad blastocélica.

Los cambios morfológicos que sufrieron los blastocistos durante el tratamiento con el medio 3 de crioprotección y dilución (ver cuadro 1), se encuentran ilustrados en la figura 4, donde se puede apreciar la des-

hidratación en forma de encogimiento, de los embriones en los medios de crioprotección (fig. 4-B) y de dilución (fig. 4-C), siendo más acentuado en este último. De igual manera, en esta lámina fotográfica se observa la recuperación de los embriones, cuando fueron colocados y cultivados en solución salina (fig. 4-D).

Los resultados de la transferencia de los blastocistos tratados con el medio 3 de congelamiento se encuentran anotados en el cuadro 3. De 57 embriones transferidos, 20 (35%) se desarrollaron en fetos, lo cuál es estadísticamente menor ($P < 0.025$) al compararse con los 33 (55%) desarrollos fetales obtenidos cuando se transfirieron embriones sin ningún tratamiento.

IV.2 Congelamiento Embrionario

Los diversos cambios morfológicos que sufrieron los embriones en el estadio de mórula, antes y después de su almacenaje en nitrógeno líquido, previamente tratados con el medio 2 de crioprotección y dilución, se encuentran ilustrados en las figuras 5 y 6.

En el cuadro 4 se encuentran los porcentajes de recuperación morfológica de los embriones (mórulas) congelados directamente en nitrógeno líquido. De 100 embriones tratados, el 44% no sufrió alteración celular (fig. 5-E2); el 15% mostró 1 a 3 blastómeros degenerados (fig. 5-E1 y 6-E2); y el 29% degeneraron totalmente (fig. 5-F2; 6-E1; 6-F1 y 6-F2); mientras que 12% correspondió a zonas pelúcidas vacías (fig. 5-F1).

Los embriones de excelente morfología y los que contaban con 1 a 3

blastómeros degenerados, después de haber sido congelados en nitrógeno líquido, se transfirieron a hembras receptoras, obteniendo solamente 4 fetos en desarrollo (fig. 7) de 53 embriones transferidos.

Cuadro 2. Resultados del tratamiento con diversos medios de crioprotección y dilución en embriones de rata No congelados.

estadio embrionario	medio de crioprotección	medio de dilución	No. emb.	emb. no recolectados -	emb. degenerados -	emb. colapsados -	emb. recuperados
Mórulas	PBS + 3M Glicerol + 0.25M Sacarosa	PBS + 0.25M Sacarosa	27	3 (11.11%)	2 (7.4%)		22 (91.66%)
	PBS + 2M Glicerol + 0.25M Sacarosa	PBS + 0.25M Sacarosa	27	1 (3.70%)	1 (3.70%)		25 (96.15%)
	PBS + 1.5M Glicerol + 0.125M Sacarosa	PBS + 1.5M Sacarosa	27	1 (3.70%)	1 (3.70%)		25 (96.15%)
Blastocistos	PBS + 3M Glicerol + 0.25M Sacarosa	PBS + 0.25M Sacarosa	27	2 (7.40%)	0	3 (11.11%)	25 (100%)
	PBS + 2M Glicerol + 0.25M Sacarosa	PBS + 0.25M Sacarosa	27	1 (3.70%)	0	1 (3.70%)	26 (100%)
	PBS + 1.5M Glicerol 1 0.125M Sacarosa	PBS + 1.5M Sacarosa	27	2 (7.40%)	1 (3.70%)	3 (11.11%)	24 (96%)

Cuadro 3. Resultados de la transferencia de blastocistos No congelados, tratados con el medio de crioprotección PBS + 1.5M Glicerol + 0.125M Sacarosa y el medio de dilución PBS + 1.5M Sacarosa.

No. embriones	emb. no recolectados	embriones degenerados	embriones colapsados	embriones transferidos	fetos desarrollados
60	1 (1.66%)	2 (3.33%)	5 (8.33%)	57 (95%)	20 (35%)

Cuadro 4. Resultados morfológicos del congelamiento directo en nitrógeno líquido de de mórulas tratadas con el medio de crioprotección PBS + 2M Glicerol + 0.25M Sacarosa y el medio de dilución PBS + 0.25M Sacarosa.

No. embriones	embriones degenerados	zonas pelúcidas vacías	embriones con 1 a 3 blastómeros destruidos	embriones de excelente morfología
100	29	12	15	44

Figura 4. Crioprotección de blastocistos de rata.

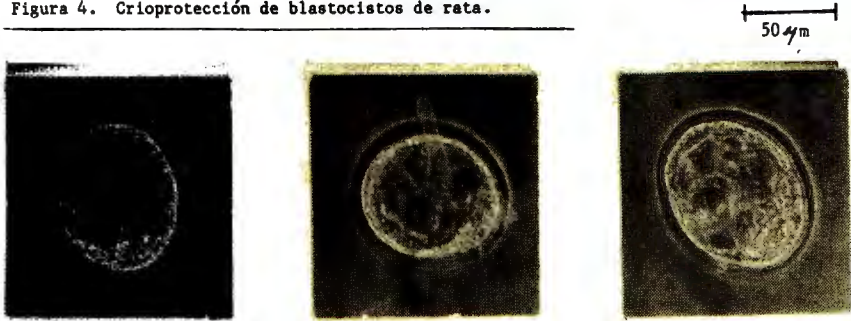


Fig. 4-A Blastocistos normales

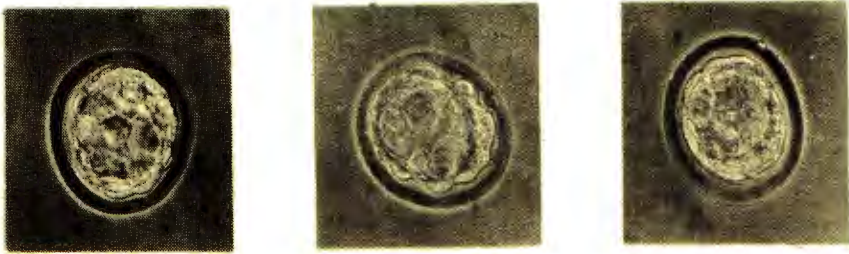


Fig. 4-B Blastocistos en el medio de crioprotección (PBS + 1.5M Glicerol + 0.125M Sacarosa)



Fig. 4-C Blastocistos en el medio de dilución (PBS + 1.5M Sacarosa)

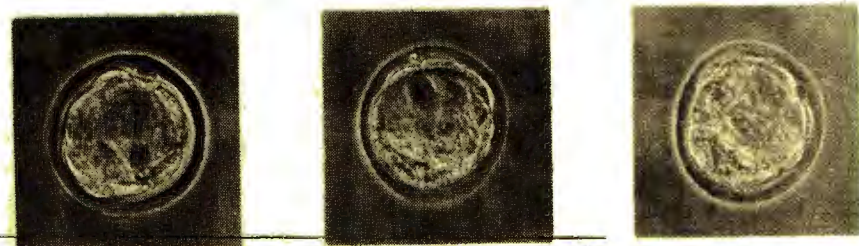


Fig. 4-D Blastocistos en solución salina (PBS suplementado)

Figura 5. Congelación rápida en nitrógeno líquido de mórulas de rata.

50 μ m

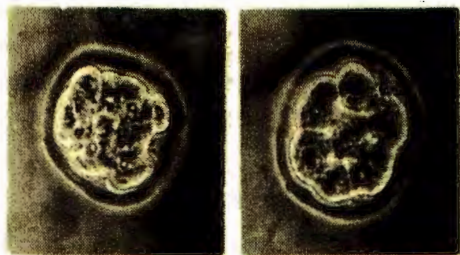


Fig. 5-A Mórulas normales

Fig. 5-B Mórulas en el medio de crioprotección
(PBS + 2.0M Glicerol + 0.25M Sacarosa)

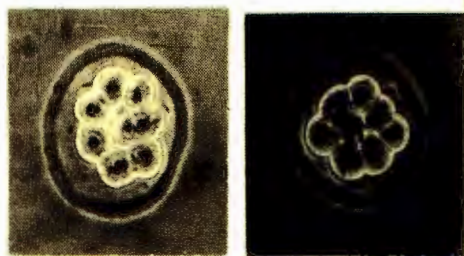
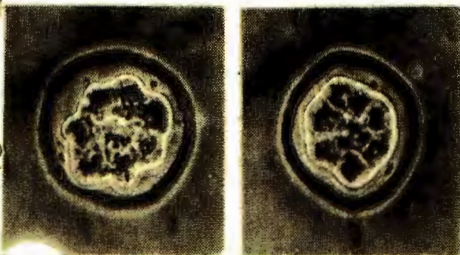


Fig. 5-C Mórulas recién descongeladas
en el medio de crioprotección

Fig. 5-D Mórulas en el medio de dilución
(PBS + 0.25M Sacarosa)

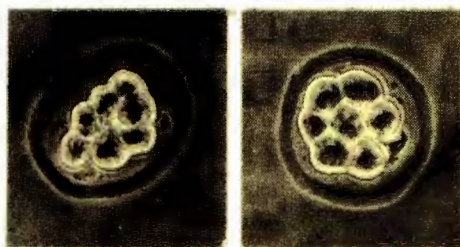
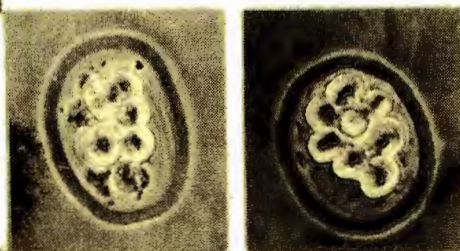


Fig. 5-E Mórulas en solución salina
(PBS suplementado)

Fig. 5-F Ejemplo de mórulas degeneradas

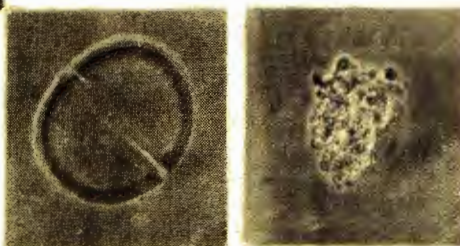


Figura 6. Congelación rápida en nitrógeno líquido de mórulas de rata

50 μ m

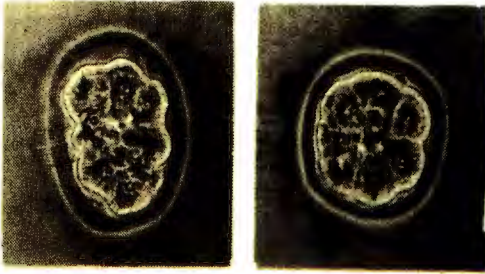


Fig. 6-A Mórulas normales

Fig. 6-B Mórulas en el medio de crioprotección
(PBS + 2.0M Glicerol + 0.25M Sacarosa)

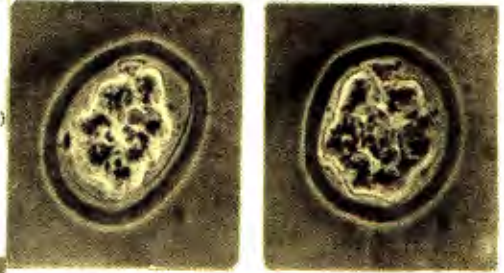


Fig. 6-C Mórulas recién descongeladas
en el medio de crioprotección

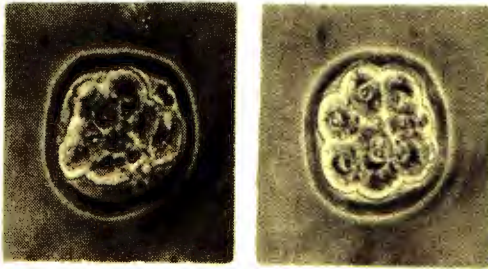


Fig. 6-D Mórulas en el medio de dilución
(PBS + 0.25M Sacarosa)

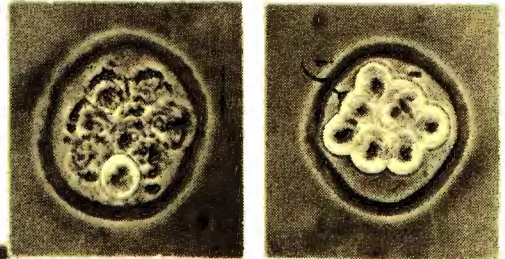


Fig. 6-E Mórulas en solución salina
(PBS suplementado)

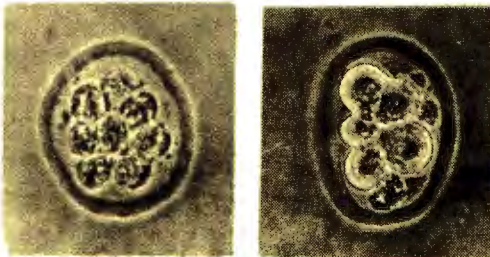


Fig. 6-F Ejemplo de mórulas degeneradas



V. D I S C U S I O N

La adición y eliminación del crioprotector es uno de los factores más importantes que se deben tomar en consideración en los trabajos de congelamiento de embriones. Como ya se mencionó anteriormente, diversos autores (19,28,31,44) han señalado que este procedimiento se debe llevar a cabo por etapas, es decir, adicionando o eliminando el crioprotector por medio de concentraciones graduales, con el objeto de impedir un choque osmótico en las células embrionarias, causado por los cambios bruscos de concentración del medio.

Sin embargo, en el presente trabajo se observó que los embriones de rata, en los estadios de mórula y blastocisto, no sufrieron alteraciones osmóticas y/o estructurales, cuando el crioprotector fué adicionado en 2 etapas de 10 min cada una; al igual, cuando éste fué removido en un solo paso, utilizando Sacarosa como diluyente.

Lo anterior es de suma importancia debido a que con este tratamiento, los embriones permanecerán menos tiempo sometidos a los diferentes medios de crioprotección y dilución, lo cuál redundará en su mayor viabilidad y en la simplificación de la técnica.

En trabajos publicados recientemente, Renard (33), Schneider (34) y Leibo (22,23), han encontrado que los embriones de conejo y bovino, pueden ser sometidos a los tratamientos de crioprotección de manera rápida, lo cuál parece indicar, junto con los resultados obtenidos en este trabajo, que esta técnica no interfiere con la viabilidad in vitro de los em--

briones.

En el estudio in vivo de los blastocistos tratados con el medio 3 de congelamiento, se obtuvo 20% menos en el desarrollo fetal que cuando se comparó con el grupo control. Esta diferencia puede ser debida a: a) la deshidratación excesiva de los blastocistos causada por la concentración alta del diluyente (1.5M Sacarosa), lo que pudo traer como consecuencia la desnaturalización irreversible de las proteínas embrionarias (20,49); y b) la destrucción de las células de la masa celular interna, causada por la severa deshidratación, por lo que el desarrollo posterior del embrión se vería afectada. No es posible, mediante observaciones morfológicas, determinar dichas alteraciones bajo el microscopio.

Probablemente si este estudio se desarrollara con los medios 1 y 2 de congelamiento, los porcentajes de fetos desarrollados serían más altos, ya que el nivel de deshidratación de los embriones es menor al igual que su daño.

Durante el tratamiento con los diversos medios de crioprotección y dilución, se observó un ligero incremento en el degeneramiento embrionario en la etapa de mórula con respecto a la de blastocisto, debido a que los primeros son más difíciles de clasificar, desde el punto de vista morfológico, por lo que al inicio del tratamiento pudieron haberse sometido a éste, embriones que poseían alguna malformación.

Tomando en consideración los resultados y observaciones anteriores, se decidió que el estado de mórula sería el adecuado para congelarse di--

rectamente en nitrógeno líquido, ya que este posee mayores posibilidades de recuperación en comparación con la etapa de blastocisto en caso de que alguna de sus células resultaran dañadas a lo largo del tratamiento, así como que carece de una cavidad interna llena de líquido (espacio blastocélico) lo cuál representa potencialmente un problema en la deshidratación del embrión y por lo tanto en la formación de cristales de hielo intracelulares.

Como se observa en el cuadro 4, el 59% de los embriones (mórulas) que fueron congelados directamente en nitrógeno líquido, presentaron una morfología buena después de su descongelado y cultivo, lo cuál es muy significativo, desde el punto de vista técnico, ya que el tratamiento de crioprotección que recibieron impidió que estos sufrieran un degeneramiento cuando fueron llevados de temperatura ambiente a -196°C , en menos de 10 segundos.

Takeda (38) y Krag (14) han obtenido igualmente resultados favorables in vitro empleando esta técnica de congelación rápida, pero en mórulas de ratón (90% y 67% respectivamente).

Quando se transfirieron al útero de hembras receptoras los embriones que presentaron buena morfología después del descongelamiento, se obtuvo solamente 7.5% de desarrollo fetal; lo que es comparable con los resultados reportados por Williams (53), cuando usó los vapores de nitrógeno por 2 min. como un paso intermedio en la técnica.

Un factor que pudo haber influido en el bajo porcentaje de desarro--

llos fetales, fué el hecho de haber realizado la transferencia de las mórulas dentro del cuerno uterino, ya que este estadio se encuentra, bajo condiciones naturales, aún en el oviducto. De esta manera, al no encontrar un ambiente adecuado, los embriones pudieron haber degenerado. La transferencia de embriones al oviducto de la rata es técnicamente difícil.

Los resultados anteriores demuestran que es posible congelar los embriones de rata directamente en nitrógeno líquido, cuando son adecuadamente deshidratados con sustancias protectoras. Sin embargo, aún es necesario continuar con este tipo de estudios con la finalidad de llegar a simplificar las actuales técnicas de congelamiento.

VI. L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Bank, H. and Maurer, R.R.: Survival of frozen rabbit embryos.
Exptl. Cell. Res. 89: 188-196 (1974).
2. Bielanski, A., Schneider, U., Powlyshyn, V. and Mapletoft, R.J.:
Effect of sample container and cryoprotectant removal method on survival of deep bovine embryos. Theriogenology 23: 179 (1985).
3. Bilton, R.J. and Moore, N.W.: In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. Aust. J. Biol. Sci. 29: 125-129 (1976).
4. Bouyssou, B. and Chupin, D.: Two-step freezing of cattle blastocysts in french-straws. Theriogenology 17: 80 (1982).
5. Bouyssou, B. and Chupin, D.: Two-step freezing of cattle blastocysts with Dimethylsulfoxyde (DMSO) or Glycerol. Theriogenology 17: 159-166 (1982).
6. Bui-Xuan-Nguyen, N., Heyman, Y. and Renard, J.P.: Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature.
Theriogenology 22: 389-399 (1984).
7. Chang, M.C.: My work on the transplantation of mammalian eggs.
Theriogenology 19: 293-301 (1983).
8. Elsdon, R.P., Seidel, G.E., Takeda, T. and Farrand, G.D.: Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. Theriogenology 17: 1-10 (1982).

9. Farrand, G.D., Elsdon, R.P. and Seidel, G.E.: Effect of slow cooling of bovine embryos prior to plunging in liquid nitrogen. Theriogenology 17: 88 (1982).
10. Foote, R.H. and Onuma, H.: Superovulation, ovum collection, culture and transfer: a review. J. Dairy. Sci. 53: 1681-1692 (1970).
11. Hahn, J. : the value of laboratory animal models in embryo transfer research. Theriogenology 21: 45-59 (1984).
12. Hunter, R.H.F.: Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. Acribia, España, 1980.
13. Kasai, M., Niwa, K. and Iritani, A.: Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert. 59: 51-56 (1980).
14. Krag, K.t., Koehler, I.M. and Wright, R.W., R.W.: A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. Theriogenology 23: 199 (1985).
15. Lasley, J.F.: Genética del mejoramiento del ganado. UTEHA. México, 1979.
16. Lehn-Jensen, H., Torbe, G. and Pérez, N.A.: Two-step freezing of cow embryos in 1.4M Glycerol. Theriogenology 15: 427-432 (1981).
17. Lehn-Jensen, H. and Torbe, G.: The survival of cow blastocysts frozen in 1.4M Glycerol after plunging between -15° and -60°C and rapid thawing. Theriogenology 17: 95 (1982).
18. Lehn-Jensen, H.: Deep freezing of cattle embryos. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. University of Illinois at Urbana-Champaign, U.S.A., 1984, II-1.

19. Leibo, S.P. and Mazur, P.: Survival of frozen-thawed mouse embryos as a function of glycerol permeation. Criobiology 11: 559 (1974).
20. Leibo, S.P., McGrath, J.J. and Cravalho, E.G.: Microscopic observations of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. Criobiology 15: 257-271 (1978).
21. Leibo, S.P.: The embriology of embryo tranfer. In: Embryo transfer in cattle. Edited by Donaldson, L.E., 32-53, Rio Vista International Inc., San Antonio Texas, U.S.A., 1982.
22. Leibo, S.P.: A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology 21: 767-790 (1984).
23. Leibo, S.P.: Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos: an update. Theriogenology 23: 201 (1985).
24. Lindner, G.M. and Ellis, D.E.: Refrigeration of bovine embryos. Theriogenology 23: 202 (1985).
25. Massip, A. Van der Zwalmen, P., Ectors, F., De Coster, R., D'Ieteren, G. and Hanzen, C.: Deep freezing of cattle embryos in glass ampules or french straws. Theriogenology 12: 79-83 (1979).
26. Maurer, R.R. and Bank, H.: Freezing and storage of eight-cell mouse embryos. Criobiology 10: 509 (1973).
27. Maurer, R.R. and Haseman, J.K.: Freezing morula stage rabbit embryos. Biol. Reprod. 14: 256-263 (1976).
28. Maurer, R.R.: Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. Theriogenology 9: 45-68 (1978).

29. Merry, D.A., Allen, R.L., Krag, K. and Wright, R.W.: Sucrose dilution of frozen mouse embryos: Interaction of glycerol and sucrose concentrations. Theriogenology 20: 325-332 (1983).
30. Niemann, H., Sacher, B., Schilling, E. and Smidt, D.: Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. Theriogenology 17: 102 (1982).
31. Polge, C. and Willadsen, S.M.: Freezing egg and embryos of farm animals. Criobiology 15: 370-373 (1978).
32. Rall, W.F., Czlankawska, M. Barton, S.C. and Polge, C.: Cryoprotection of day-4 mouse by methanol. J. Reprod. Fert. 70: 293-300 (1982).
33. Renard, J.P., Bui-Xuan-Nguyen and Garnier, V.: Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. J. Reprod. Fert. 71: 573-580 (1984).
34. Schneider, U. and Mazur, P.: Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. Theriogenology 21: 68-79 (1984).
35. Seidel, G.E.: Superovulation and embryo transfer in cattle. Science 211: 351-358 (1981).
36. Surgie, T. Siedel, G.E. and Hafez, E.S.E.: Transplante de embriones. En: Reproducción e Inseminación artificial en animales. Editado por: Hafez, E.S.E., Interamericana, México, 1980.

37. Takeda, T. and Elsdén, R.P.: Comparison of cryoprotectants for freezing mouse embryos. Theriogenology 17: 109 (1982).
38. Takeda, T., Elsdén, R.P. and Seidel, G.E.: Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. Theriogenology 21: 115 (1984).
39. Takeda, T. Elsdén, R.P. and Seidel, G.E.: Survival of cryopreservation bovine embryos cooled at 0.5° or 1°C/minute. Theriogenology 23: 233 (1985).
40. Tervit, H.R. and Elsdén, R.P.: Development and viability of frozen-thawed cattle embryos. Theriogenology 15: 395-403 (1981).
41. Vicent, C., Heyman, Y., Garnier, V., Smorag, Z. and Renard, J.P.:
In vitro survival of early-stage rabbit and cow embryos directly frozen to intermediate temperature (-25° to -30°C) before plunging in liquid nitrogen. Theriogenology 23: 234 (1985).
42. Whittingham, D.G.: Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature 233: 125-126 (1971).
43. Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to -196° and 260°C. Science 178: 411-414 (1972).
44. Whittingham, D.G.: The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. J. Reprod. Fert. 37: 159-162 (1974).
45. Whittingham, D.G. and Adams, C.E.: Low Temperature preservation of rabbit embryos. Criobiology 11: 560 (1974).

46. Whittingham, D.G.: Survival of rat embryos after freezing and thawing. J. Reprod. Fert. 43: 575-578 (1975).
47. Whittingham, D.G.: Low temperature preservation of embryos. In: Embryo transfer in farm animals. Edited by Betteridge. J.K., 50-53, Canada Dept. Agric., Canada, 1976.
48. Whittingham, D.G. and Adams, C.E.: Low temperature preservation of rabbit embryos. J. Reprod. Fert. 47: 269-274 (1976).
49. Whittingham, D.G.: Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. J. Reprod. Fert. 56: 11-21 (1979).
50. Wideman, D.: The genetic basis for embryo transfer. In: Embryo transfer in cattle. Edited by Donaldson, L.E., 3-17. Rio Vista International, Inc., San Antonio Texas, U.S.A., 1982.
51. Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moore, R.M.: Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fert. 46: 151-154 (1976).
52. Willadsen, S.M., Polge, C. and Rowson, L.E.A.: The viability of deep frozen cow embryos. J. Reprod. Fert. 52: 391-393 (1978).
53. Williams, T.J. and Johnson, S.E.: Quick-freezing of day four mouse embryos. Theriogenology 23: 272 (1985).
54. Wilmut, I.: The effect of cooling rate, warming rate. cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci. 11: 1071-1079 (1972).
55. Wilmut, I. and Rowson, L.E.A.: Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 92: 686-690 (1973).

56. Wood, M.J. and Farrant, J.: Preservation of mouse embryos by two step freezing. Criobiology 17: 17-29 (1985).