



# CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS

E.A. Martínez, J.M. Vázquez, J. Roca, C. Cuello, I. Parrilla y M.A. Gil

Departamento de Medicina y Cirugía Animal (Reproducción y Obstetricia)  
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia

## RESUMEN

*En este capítulo se revisan las principales utilidades de este procedimiento de conservación, así como los métodos existentes para la congelación de embriones de porcino, presentándose los resultados obtenidos in vivo e in vitro con embriones descongelados.*

*La elevada presencia de lípidos intracitoplasmarios en los embriones porcinos ha sido el hándicap con el que se ha trabajado en criopreservación, por ello se opta por el método de vitrificación. Recientemente se han desarrollado varias técnicas para aumentar la velocidad de enfriamiento en la vitrificación. Entre ellas destaca la OPS (open pulled straw). Este método ya ha sido empleado con éxito en la especie porcina en la vitrificación de embriones.*

*En la actualidad nuestro equipo de investigación está trabajando en colaboración con el INRA en el desarrollo de diferentes técnicas para incrementar la eficiencia y simplificar el proceso de descongelación.*



## INTRODUCCIÓN

Como es sabido, los embriones porcinos son más sensibles al daño causado por la criopreservación que los embriones de otras especies (Dobrinsky, 1997; Pollard y Leibo, 1994). Sólo se ha conseguido el nacimiento de un número muy limitado de lechones tras la transferencia quirúrgica de embriones congelados/descongelados por los métodos tradicionales (velocidad lenta de enfriamiento) (Modl et al., 1996; Nagashima et al., 1994a). La presencia de una gran cantidad de lípidos intracitoplasmáticos en los embriones porcinos ha sido, aparentemente, el principal obstáculo para lograr unos resultados aceptables tras la descongelación embrionaria, habiéndose indicado que los métodos convencionales de criopreservación no son adecuados para la conservación a largo plazo de los embriones porcinos (revisado por Dobrinsky, 1997, 2002). Como método alternativo, se está utilizando la vitrificación. Ésta consiste en un enfriamiento rápido de un medio líquido con ausencia de formación de cristales de hielo (Rall y Fahy, 1985). La utilización de este sistema con pajuelas de 0,25 ml ha resultado en el nacimiento de lechones a partir de blastocistos eclosionados (Dobrinsky et al., 1998, 2000; Kobayashi et al., 1998a), embriones que como es sabido no son aptos para el transporte nacional o internacional al estar desprotegidos de la zona pelucida y ser, por tanto, susceptibles de estar infectados por agentes patógenos. Sin embargo, sólo hay una referencia de lechones nacidos cuando la vitrificación en dichas pajuelas se realizó con blastocistos no eclosionados (Kobayashi et al., 1998b). Recientemente se han desarrollado varias técnicas para aumentar la velocidad de enfriamiento de los embriones durante la vitrificación. Entre ellas, destaca la tecnología OPS (open pulled straw) que permite vitrificar a los embriones en un reducido volumen de medio (2 ml) y conseguir una gran velocidad de enfriamiento (Vajta et al., 1997, 1998). Este método ha sido utilizado con éxito para vitrificar ovocitos y embriones en bovino y se han alcanzado altas tasas de supervivencia in vitro tras la vitrificación de embriones de otras especies, incluyendo la especie porcina (Holm et al., 1999; Le Gal et al., 2000; Martino et al., 1996; Vajta et al., 1997; Berthelot et al., 2000b). La mayor velocidad de enfriamiento parece ser la clave para proteger a los embriones porcinos de las injurias del frío y para permitir obtener lechones viables después de la vitrificación de blastocistos no eclosionados (Berthelot et al., 2000b, 2001, 2002; Cameron et al., 2000; Beebe et al., 2000).

El desarrollo de un método repetitivo para la conservación a largo plazo de los embriones porcinos en conjunción con un método práctico de transferencia no quirúrgica de embriones (Hazeleger y Kemp, 1999; Martínez et al., 2002) posibilitará numerosas aplicaciones desde el punto de vista de producción, investigación y medicina:

- Creación de bancos de embriones a partir de líneas genéticas determinadas.
- Conservación indefinida del material genético.
- Transporte internacional de embriones.
- Introducción de nuevas líneas genéticas con un mínimo riesgo de transmisión de enfermedades.
- En un futuro, cuando las técnicas de sexaje y otras muchas biotecnologías (clonación, transgénesis, xenotransplantes, etc.) lleguen a ser de aplicación práctica, la transferencia de embriones por vía no quirúrgica conjuntamente con la vitrificación de embriones será una herramienta imprescindible para la culminación de dichas técnicas en la especie porcina.

El objetivo de este trabajo es el de revisar los métodos existentes para criopreservar embriones en la especie porcina y presentar los resultados obtenidos in vitro e in vivo utilizando embriones descongelados.

## PRINCIPIOS BÁSICOS EN CRIOBIOLOGÍA

El agua es el principal componente de las células vivas y su estructura física depende de los cambios de temperatura a los que sea sometida. Cuando una suspensión celular se somete a bajas temperaturas se producirá la formación de cristales de hielo en el medio extracelular. Si se forman cristales de hielo en el interior de la célula, las posibilidades de supervivencia serán muy limitadas debido a los daños mecánicos provocados en su interior durante la formación y el crecimiento de dichos cristales. Por otra parte, el hielo es un pobre solvente. Cuando en el medio extracelular se forman cristales de hielo, los solutos se concentran sin formar parte del hielo y las células en suspensión comienzan a deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hiperosmótico.

Existen distintos procedimientos para evitar la formación intracelular de cristales de hielo como son el sobreenfriamiento, la disminución del punto de congelación, la deshidratación y la vitrificación intracelular.



### CRIOPROTECTORES

La criopreservación de embriones ha sido posible gracias al descubrimiento y desarrollo de componentes químicos con propiedades crioprotectoras. Los crioprotectores son necesarios en las soluciones de congelación ya que previenen el daño celular durante la congelación y descongelación. Curiosamente, el valor de los crioprotectores fue descubierto accidentalmente. En 1949, Polge et al. suplementaron de forma inadvertida una solución experimental de congelación con glicerol, dando como resultado una inesperada supervivencia de las células congeladas. Actualmente, en los sistemas de congelación de embriones se utilizan crioprotectores clasificados en tres grupos. A continuación se nombran los más utilizados:

- 1) Crioprotectores permeables de bajo peso molecular: etilenglicol (Pm = 62,07), propanodiol (Pm = 76,1), DMSO (Pm = 78,1) y glicerol (Pm = 92,1).
- 2) Crioprotectores no permeables de bajo peso molecular: galactosa (Pm = 180,2), glucosa (Pm = 181,1), sacarosa (Pm = 342,2) y trealosa (Pm = 378,3).
- 3) Crioprotectores no permeables de alto peso molecular: polivinilpirrolidona (PVP) y polivinil alcohol (PVA).

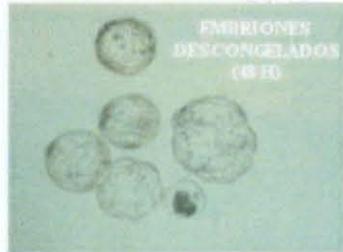
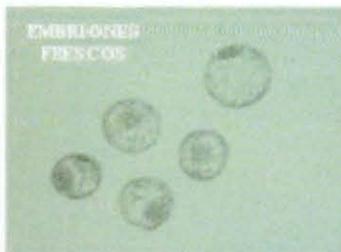
Aunque la acción crioprotectora de estos compuestos no se conoce en su totalidad, los crioprotectores de cada grupo juegan diferentes papeles durante el enfriamiento y la descongelación. La presencia de crioprotectores permeables es absolutamente necesaria. Estos agentes reemplazan osmóticamente el agua intracelular en las células embrionarias antes del enfriamiento y en combinación con una velocidad de enfriamiento baja, reducen los cambios en el volumen de las células y minimizan la formación de cristales de hielo intracelular. Los crioprotectores no permeables de bajo peso molecular favorecen la deshidratación de las células antes del enfriamiento, lo que resulta en una reducida formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación y previenen el choque osmótico, controlando la rehidratación intracelular, durante la descongelación. Sin embargo, estos crioprotectores deben ser combinados con crioprotectores permeables para proteger efectivamente a las células durante la congelación. Los crioprotectores de alto peso molecular protegen a las células embrionarias durante la congelación y descongelación produciendo la formación de cristales de hielo de forma y tamaño inocuos. En la práctica, la criopreservación de embriones por el método convencional de congelación lenta se realiza utilizando un único crioprotector, tal como el glicerol, etilenglicol o DMSO. Cuando se utilizan métodos con alta velocidad de congelación o cuando se emplea la técnica de vitrificación se suelen combinar dos crioprotectores en el medio de congelación, tales como glicerol/etilenglicol, glicerol/propanodiol, etilenglicol/DMSO en combinación con sacarosa, etc. La adición y eliminación de los crioprotectores puede realizarse en varias o en una sola etapa.

protección de cada grupo juegan diferentes papeles durante el enfriamiento y la descongelación. La presencia de crioprotectores permeables es absolutamente necesaria. Estos agentes reemplazan osmóticamente el agua intracelular en las células embrionarias antes del enfriamiento y en combinación con una velocidad de enfriamiento baja, reducen los cambios en el volumen de las células y minimizan la formación de cristales de hielo intracelular. Los crioprotectores no permeables de bajo peso molecular favorecen la deshidratación de las células antes del enfriamiento, lo que resulta en una reducida formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación y previenen el choque osmótico, controlando la rehidratación intracelular, durante la descongelación. Sin embargo, estos crioprotectores deben ser combinados con crioprotectores permeables para proteger efectivamente a las células durante la congelación. Los crioprotectores de alto peso molecular protegen a las células embrionarias durante la congelación y descongelación produciendo la formación de cristales de hielo de forma y tamaño inocuos. En la práctica, la criopreservación de embriones por el método convencional de congelación lenta se realiza utilizando un único crioprotector, tal como el glicerol, etilenglicol o DMSO. Cuando se utilizan métodos con alta velocidad de congelación o cuando se emplea la técnica de vitrificación se suelen combinar dos crioprotectores en el medio de congelación, tales como glicerol/etilenglicol, glicerol/propanodiol, etilenglicol/DMSO en combinación con sacarosa, etc. La adición y eliminación de los crioprotectores puede realizarse en varias o en una sola etapa.

### CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS

La congelación de embriones podría definirse como un estado de conservación indefinido a temperaturas muy bajas donde el metabolismo y otras funciones celulares del embrión no existen o se encuentran enormemente reducidas, pudiéndose restablecer dichas funciones y presentar un desarrollo normal una vez que termina el período de conservación (Dobrinsky, 2000). Mientras existen métodos para criopreservar embriones en la mayoría de las especies ganaderas, el desarrollo de esta tecnología ha sido muy posterior en la especie porcina. Los embriones de cerdo presentan una elevada sensibilidad al frío, lo cual limita su capacidad para soportar la mayoría de los métodos convencionales de preservación. Muchas investigaciones se han centrado sobre el elevado contenido lipídico de los embriones porcinos y su relación con la sensibilidad hipotérmica de los embriones. Se han realizado diferentes estudios sobre la supervivencia de los embriones porcinos sometidos a los programas convencionales de conge-

### VITRIFICACIÓN OPS BLASTOCISTOS





ción (congelación lenta), pero en ninguno de ellos se ha obtenido una eficiencia similar a la alcanzada en otras especies (revisado por Berthelot et al., 2003). En los últimos años la vitrificación se está desarrollando como una alternativa a los métodos tradicionales de criopreservación con resultados muy esperanzadores.

### **Congelación convencional**

La primera etapa de este sistema de congelación consiste en exponer y equilibrar los embriones con la solución de crioprotector empleada (crioprotectores permeables) durante 15-25 minutos. Los embriones se contraen debido a la pérdida de agua intracelular. Esta disminución de volumen embrionario se debe a que la solución extracelular es inicialmente hiperosmótica y al hecho de que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores. La contracción embrionaria cesa cuando se alcanza un equilibrio entre la salida de agua fuera del embrión y la entrada de crioprotector dentro de él (Schneider y Mazur, 1984). A medida que el crioprotector penetra en el embrión, éste comienza a reexpandirse debido a la reentrada de agua para mantener el equilibrio osmótico. Después de este período de equilibrio, las pajuelas, que contienen los embriones, son enfriadas rápidamente desde temperatura ambiente hasta 0°C. El "seeding" se realiza entre -4 y -7°C. "Seeding" es el término usado para describir el inicio controlado de la formación de hielo extracelular a temperaturas ligeramente sobreenfriadas y se puede realizar contactando la pared de la pajuela con unas pinzas introducidas previamente en nitrógeno líquido o de forma automática cuando se utilizan biocongeladores. Después del "seeding" el hielo extracelular se forma rápidamente en toda la pajuela, produciéndose un incremento en la concentración de sales en el medio extracelular. Una vez que el hielo se forma, los embriones se enfrían lentamente (0,3-0,6°C por minuto) hasta alcanzar los -40°C o los -60°C de temperatura, permitiéndoles perder tanto agua como sea posible, mientras que el medio intracelular se conserva sobreenfriado hasta la congelación. Así, se previene la formación de hielo intracelular. Una vez alcanzada una de las dos temperaturas, los embriones se introducen directamente en nitrógeno líquido. Durante el "seeding" y el descenso controlado de temperatura se produce una nueva contracción de los embriones debido a la exosmosis de agua desde su citoplasma. Sin embargo, no hay cambios en el volumen del embrión durante la etapa de inmersión directa en nitrógeno líquido o durante su posterior conservación. El método de descongelación de los embriones depende del procedimiento utilizado durante su congelación. En general, para obtener la máxima supervivencia, los embriones introducidos en nitrógeno líquido a -40°C requieren una rápida desconge-

lación (300°C/minuto), mientras que aquellos que fueron inmersos a -60°C en el nitrógeno líquido pueden ser descongelados más lentamente (20°C/minuto). Los embriones congelados a -40°C todavía conservan agua residual en su citoplasma que vitrifica y puede recrystalizar durante una descongelación lenta, causando severos daños intracelulares (Polge et al., 1974). Por el contrario, los embriones enfriados lentamente hasta -60°C se encuentran más deshidratados y no se produce la recrystalización cuando se someten a una descongelación lenta (Whittingham, 1980). En general, el método de descongelación implica las siguientes fases: 1) Descongelación de las pajuelas en aire a temperatura ambiente e inmersión de las mismas en agua (Rall, 1992). Durante esta fase, desaparecen los cristales de hielo extracelulares y por consiguiente se reduce la osmolaridad del medio extracelular. Esto determina la entrada de agua al interior del embrión para restablecer el equilibrio osmótico; 2) Extracción del crioprotector: los primeros trabajos sobre congelación/descongelación de embriones bovinos indicaron que el crioprotector debía eliminarse después de la descongelación transfiriendo los embriones en múltiples etapas a soluciones de PBS con concentraciones decrecientes del crioprotector hasta introducirlos en PBS con suero. En 1982 se introdujo el método de una etapa (Leibo, 1982). En este sistema, el embrión descongelado es transferido desde el medio de congelación a un medio que contiene una concentración hiperosmótica de un crioprotector no permeable (sacarosa). La sacarosa se comporta como una sustancia osmóticamente muy activa y que no penetra en el embrión. La tendencia del agua a penetrar en el interior del embrión para diluir el crioprotector permeable se encuentra contrarrestada por la tendencia del agua a salir fuera del embrión debido a la elevada concentración de sacarosa en el medio exterior. Por tanto el embrión no se hincha, sino que por el contrario se contrae debido a la salida pasiva del crioprotector permeable. En ese momento, el embrión puede ser rápidamente diluido en un medio isoosmótico o directamente transferido. Esta metodología ha sido adaptada para embriones bovinos de tal forma que el medio de dilución con sacarosa se encuentra introducido en la pajuela de congelación separado por burbujas de aire del embrión. Una vez realizada la descongelación, la pajuela se agita para conseguir que el embrión contacte con el medio de dilución, permitiéndose la equilibración del mismo antes de proceder a su transferencia (Leibo, 1984).

Cuando estos sistemas convencionales de congelación/descongelación se aplicaron a los embriones de cerdo, los resultados obtenidos fueron pobres e inconsistentes (tablas I y II: Berthelot et al., 2003). Sin embargo, en estos trabajos se puso de manifiesto que los embriones porcinos podían sobrevivir a los



**Tabla I**

**CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS CON EL MÉTODO DE VELOCIDAD LENTA DE ENFRIAMIENTO. DESARROLLO IN VITRO DE LOS EMBRIONES SEGÚN EL ESTADIO DE DESARROLLO EN EL MOMENTO DE LA CONGELACIÓN (ADAPTADO DE BERTHELOT ET AL., 2003)**

Estado embrionario	Concentración final del crioprotector (Moles)*	Tratamiento embrionario	Embriones congelados (n°)	Supervivencia %	Referencias
2-4 células	1,5 P	Centrifugados + depilados	64	13	Nagashima et al. (1994)
Mórula	1,5 P + 0,1 S	Delipidados	27	63	Nagashima et al. (1999)
Blastocistos	1,5 G	No	30	0	Nagashima et al. (1992)
	1,5 P	Centrifugados	31	61	Nagashima et al. (1999)
Blastocistos expandidos	1,5 G	No	57	2	Kashiwasaki et al. (1991)
	1,5 G	No	66	24	Nagashima et al. (1992)
	1,5 G	No	21	10	Cameron et al. (1992)
	1,5 G + yema	No	79	3	Fujino et al. (1993)
	1,5 G	No	36	22	Mödl et al. (1996)
Blastocistos	1,5 G	No	38	0	Kashiwasaki et al. (1991)
Perieclósión	1,5 G	No	19	26	Mödl et al. (1996)
Blastocistos Eclósionados	1,5 G	No	82	11	Kashiwasaki et al. (1991)
	1,5 G	No	85	19	Nagashima et al. (1992)
	1,5 G	No	26	12	Cameron et al. (1992)
	1,5 G + yema	No	46	22	Fujino et al. (1993)
	1,5 G	No	34	50	Mödl et al. (1996)

\* P, Propanodiol; S, Sacarosa; G, Glicerol.

procesos de congelación/descongelación. De estos estudios se puede concluir que la supervivencia de los embriones porcinos después de la criopreservación se encuentra correlacionada con el estado de desarrollo embrionario, mientras que los embriones en estadio de mórula o blastocisto temprano no son capaces de sobrevivir a estos procedimientos de congelación/descongelación, los estadios de blastocisto expandido y eclósionado presentan características más compatibles con dichos procesos. Se ha sugerido que el alto contenido lipídico de los embriones porcinos, los cuales cambian entre el estadio de mórula/blastocisto temprano y los estadios posteriores, presentan un posible efecto sobre la supervivencia embrionaria a la criopreservación. Nagashima et al. (1994b, 1995) ofrecieron la primera evidencia de que los lípidos intracelulares estaban asociados con la sensibilidad al enfriamiento y a la congelación de los embriones porcinos. Ellos aislaron los lípidos embri-

narios por centrifugación (13.000-15.000 g) y usaron un micromanipulador para extraerlos del embrión (delipidación). Más de la mitad de los embriones delipidados en el estadio de 2-8 células sobrevivieron a la criopreservación, mientras que la supervivencia de los embriones control (no delipidados) fue nula. Estos resultados demuestran claramente que la tolerancia de los embriones porcinos a la criopreservación aumenta cuando su contenido en lípidos se reduce.

En conclusión, los diferentes trabajos sobre congelación de embriones porcinos utilizando una velocidad lenta de enfriamiento demuestran que dichos embriones pueden ser criopreservados, pero que ninguno de los métodos empleados es lo suficientemente eficiente desde un punto de vista de su aplicación práctica.



**TABLA II**

**CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS CON EL MÉTODO DE VELOCIDAD LENTA DE ENFRIAMIENTO. DESARROLLO IN VIVO DE LOS EMBRIONES PORCINOS CONGELADOS/DESCONGELADOS DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA A LAS RECEPTORAS (ADAPTADO DE BERTHELOT ET AL., 2003)**

Estado embrionario	Concentración final del crioprotector (Moles)*	Tratamiento embrionario	Nº gestaciones/ Nº transferencias	Lechones nacidos/ embriones transferidos	Referencias
2-4 células	1,5 P+0,1 S	Centrifugados + depilados	1/1	3/39	Nagashima et al. (1995)
Mórula	1,5 G	No	1/3	2/42	Kosarcic et al. (1995)
Blastocistos					
Blastocistos expandidos	1,5 G + yema	No	0/2	0/30	Fujino et al. (1993)
Blastocistos perieclósión	1,5 G + yema	No	1/4	1/27	Fujino et al. (1993)
Blastocistos eclosionados	1,5 G	No	2/7	8/141	Mödl et al. (1996)
	1,5 G	No	1/1	4/32	Kashiwasaki et al. (1991)

\* P, Propanodiol; S, Sacarosa; G, Glicerol.

### Vitrificación

La vitrificación es el enfriamiento rápido de un medio líquido sin formación de cristales de hielo. El medio forma una especie de vidrio amorfo como consecuencia del rápido enfriamiento que se obtiene al sumergir directamente los embriones en nitrógeno líquido. En contraste a los métodos convencionales de congelación descritos anteriormente, durante la vitrificación la solución entera permanece sin cambios, ya que el agua no precipita y, por tanto, no se forman cristales de hielo (Fahy et al., 1984). Así, los embriones no se exponen al daño físico asociado a la formación de cristales de hielo (Rall y Fahy, 1985). Desde un punto de vista físico, la vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas, no por la cristalización del agua sino por la extrema elevación de la viscosidad durante el enfriamiento (Fahy et al., 1984). Para conseguir esto, es necesario emplear una alta concentración de crioprotectores. Una consecuencia negativa de este requisito es que algunos crioprotectores a la concentración mínima necesaria para la vitrificación son tóxicos para la célula. El crioprotector más comúnmente utilizado es el etilenglicol ya que parece presentar una baja toxicidad sobre los embriones de ratón (Emiliani et al., 2000). Además, una práctica común

para disminuir la toxicidad del crioprotector, pero no su efectividad, es situar los embriones en una solución de etilenglicol menos concentrada antes de transferirlos a la solución de vitrificación con la concentración definitiva del crioprotector. En la actualidad, la solución de vitrificación suele estar compuesta por una combinación casi equimolar de etilenglicol/DMSO y un disacárido como la sacarosa (crioprotector no permeable). La adición de un azúcar a una solución de vitrificación basada en etilenglicol reduce significativamente la cantidad requerida de crioprotector y, por tanto, reduce la toxicidad de la solución. Además, la incorporación de compuestos no permeables en la solución de vitrificación y la incubación de las células en esta solución antes de la vitrificación ayuda a la salida del agua intracelular y reduce, por tanto, el tiempo de exposición de las células a los efectos tóxicos del crioprotector. La sacarosa también actúa como un tampón osmótico para reducir el choque osmótico que de otra forma se produciría durante la descongelación.

Existen dos sistemas de vitrificación para criopreservar embriones porcinos. La vitrificación clásica, que se efectúa en pajuelas estándar de inseminación (0,25 ml) y permite una velocidad de enfriamiento de 2.500°C/minuto (Mazur et al., 1992; Rall y Fahy, 1985)



**TABLA III**  
**CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS POR EL MÉTODO DE VITRIFICACIÓN. DESARROLLO IN VITRO DE LOS EMBRIONES SEGÚN EL ESTADIO DE DESARROLLO EN EL MOMENTO DE LA CONGELACIÓN (ADAPTADO DE BERTHELOT ET AL., 2003)**

Estado embrionario	Concentración final del crioprotector (Moles)*	Tratamiento embrionario	Embriones congelados (n°)	Supervivencia (%)	Referencias
2-4 células	7 EG + 1 S	Centrifugados + delipidados	17	50	Nagashima et al. (1999)
	7 EG + 1 S	Centrifugados	17	9	Nagashima et al. (1999)
Mórula					
Blastocistos	6,5 G + BSA	No	59	0	Dobrinsky y Jonson (1994)
	6,5 G + BSA	Citocalasina	17	6	Dobrinsky et al. (1997)
	8 EG + 7% PVP	No	128	23	Kobayashi et al. (1998b)
Blastocistos expandidos	6,5 G +BSA	No	64	27	Dobrinsky y Jonson (1994)
	6,5 G + BSA	Citocalasina	25	60	Dobrinsky et al. (1997)
	8 EG + 7% PVP	No	106	54	Kobayashi et al. (1998b)
Blastocistos perieclósion					
Blastocistos eclosionados	6,5 G +BSA	No	84	39	Dobrinsky y Jonson (1994)
	6,5 G + BSA	Citocalasina	70	74	Dobrinsky et al. (1997)
	8 EG + 7% PVP	No	131	35	Kobayashi et al. (1998b)

\*EG, Etilenglicol; G, glicerol; S, sacarosa; BSA, albúmina sérica bovina; PVP, polivinil pirrolidona.

y el método "Open Pulled Straw" (OPS) desarrollado por Vatja et al. (1997) que permite que la temperatura descienda a 18.000°C/minuto.

### Vitrificación en pajuelas de 0,25 ml

La vitrificación clásica ha demostrado in vitro ser más eficiente que la congelación tradicional. La utilización de este sistema con pajuelas de 0,25 ml ha resultado en el nacimiento de lechones a partir de blastocistos eclosionados (Dobrinsky et al., 1998, 2000; Kobayashi et al., 1998a), embriones que como es sabido no son aptos para el transporte nacional o internacional al estar desprotegidos de la zona pelúcida y ser, por tanto, susceptibles de estar infectados por agentes patógenos. Sin embargo, sólo hay una referencia de lechones nacidos cuando la vitrificación en dichas pajuelas se realizó con blastocistos no eclosionados (Kobayashi et al., 1998b). Recientemente, se ha desarrollado un procedimiento para embri-

nes porcinos en estadio de blastocisto con el que se ha obtenido una excelente tasa de partos y un adecuado tamaño de la camada después de la transferencia quirúrgica a las hembras receptoras (Dobrinsky et al., 2001). Sin embargo, este procedimiento implica varias etapas ya que es necesario tratar a los embriones antes y después de la congelación con estabilizadores del citoesqueleto y pronasa, respectivamente, lo cual aumenta el tiempo necesario durante la vitrificación (66 minutos) y la descongelación (199 minutos). Además, para realizar este procedimiento se requiere un laboratorio equipado y técnicos especializados, lo que dificulta enormemente su utilización a nivel práctico. Berthelot et al. (2003) han resumido los principales avances publicados utilizando la vitrificación clásica (tablas III y IV).

### Vitrificación con el método OPS

Recientemente se han desarrollado varias técnicas para aumentar la velocidad de enfria-



**TABLA IV**

**CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS POR EL MÉTODO DE VITRIFICACIÓN. DESARROLLO IN VIVO DE LOS EMBRIONES PORCINOS CONGELADOS/DESCONGELADOS DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA A LAS RECEPTORAS (ADAPTADO DE BERTHELOT ET AL., 2003)**

Estado embrionario	Concentración final del crioprotector (Moles)*	Tratamiento embrionario	Nº gestaciones/ Nº transferencias	Lechones nacidos/ embriones transferidos	Referencias
2-4 células					
Mórula					
Blastocistos	6,5 G + BSA	Citocalasina+ centrifugación + pronasa	9/11	61/330	Dobrinsky et al. (2001)
Blastocistos expandidos	8 EG + 7% PVP	No	1/1	4/20	Kobayashi et al. (1998b)
Blastocistos perieclusión	8 EG + 7% PVP	No	0/2	0/44	Kobayashi et al. (1998b)
Blastocistos eclosionados	8 EG + 7% PVP	No	3/15	11/338	Kobayashi et al. (1998a)
Blastocistos	6,5 G + BSA	Citocalasina	2/5	10/165	Dobrinsky et al. (1998)
Blastocistos	6,5 G + BSA	Citocalasina	6/12	39/381	Dobrinsky et al. (2000)

\*EG, Etilenglicol; G, Glicerol; S, Sacarosa; BSA, albúmina sérica bovina; PVP, polivinil pirrolidona.

miento de los embriones durante la vitrificación. Entre ellas, destaca la tecnología OPS que permite vitrificar a los embriones en un reducido volumen de medio (2 µl) y conseguir una velocidad de enfriamiento de 18.000°C/min (Vajta et al., 1997, 1998). Este método ha sido utilizado con éxito para vitrificar ovocitos y embri-

nes en bovino y se han alcanzado altas tasas de supervivencia in vitro tras la vitrificación de embriones de otras especies, incluyendo la especie porcina (Holm et al., 1999; Le Gal et al., 2000; Martino et al., 1996; Vajta et al., 1997; Berthelot et al., 2000a). La mayor velocidad de enfriamiento parece ser la clave que protege a los

**TABLA V**

**MEDIOS Y TIEMPOS EMPLEADOS EN LA VITRIFICACIÓN/DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS**

Vitrificación	Tiempo (minuto)	Descongelación	Tiempo (min)
TCM	1	TCM + 0,13M S	1
TCM	1	TCM + 0,13M S	5
TCM + 7,5%DMSO+7,5%EG	3	TCM + 0,075M S	5
TCM+17%DMSO+17%EG+0,4S	1	TCM	5

TCM, Hepes TCM 1999 + 20%NBSC; DMSO, dimetil sulfóxido; EG, etilenglicol; S, sacarosa.



## CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS

embriones porcinos de las injurias del frío y que permite obtener lechones viables después de la vitrificación de blastocistos no eclosionados (Berthelot et al., 2000b, 2001a,b, 2002; Cameron et al., 2000; Beebe et al., 2000). El tiempo requerido para la vitrificación y la descongelación es de 7 y 15 minutos, respectivamente. En la **tabla V** se resumen los crioprotectores utilizados y los tiempos de equilibración y calentamiento utilizados en este sistema. Las tasas de supervivencia embrionaria in vitro y las tasas de parto y prolificidad obtenidas utilizando embriones en diferentes estadios de desarrollo vitrificados con esta metodología se resumen en las **tablas VI** y **VII** (Berthelot et al., 2003).

Como puede observarse, el método OPS de vitrificación parece ser una técnica eficiente para la criopreservación de mórulas y blastocistos por-

cinos. En la actualidad, nuestro equipo de investigación en colaboración con el INRA está desarrollando distintas experiencias para incrementar la eficiencia del sistema y para simplificar el procedimiento de descongelación. En este sentido, se ha desarrollado un experimento para comprobar las tasas de supervivencia in vitro de los embriones vitrificados a diferentes velocidades de enfriamiento (desde 18.000°C/minuto hasta más de 100.000°C/minuto). Asimismo, se ha desarrollado un procedimiento de descongelación directa (una etapa) en combinación con la transferencia no quirúrgica de los embriones para evitar el uso de equipos y técnicos especializados a nivel de granja. Así, se han obtenido los primeros lechones nacidos a partir de embriones vitrificados y descongelados en una etapa con unas tasas de parto y una prolificidad muy esperanzadoras (Cuello et al., 2002).

**TABLA VI**

**CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS POR EL MÉTODO OPS DE VITRIFICACIÓN. DESARROLLO IN VITRO DE LOS EMBRIONES SEGÚN EL ESTADIO DE DESARROLLO EN EL MOMENTO DE LA CONGELACIÓN (ADAPTADO DE BERTHELOT ET AL., 2003)**

Estado embrionario	Concentración final del crioprotector (Moles)*	Tratamiento embrionario	Embriones congelados (n°)	Supervivencia (%)	Referencias
2-4 células					
Mórula	3,2 EG +2,5DMSO + 0,6 S	No	10	70	Vatja et al. (1998)
	3,2 EG +2,5DMSO + 0,6 S	No	118	12	Berthelot et al. (2000b)
	8 EG + 7% PVP	Sí,a	77	71	Beebe et al. (2002)
Blastocistos	3,2 EG +2,5DMSO + 0,6 S	No	29	67	Vatja et al. (1998)
	8 EG + 7% PVP	Sí,b	25	0	Beebe et al. (2002)
	8 EG + 7% PVP	Sí,c	30	77	Beebe et al. (2002)
Blastocistos expandidos	3,2 EG + 2,5DMSO + 0,6 S	No	59	71	Holm et al. (1999)
Blastocistos perieclusión					
Blastocistos eclosionados					

\*EG, Etilenglicol; DMSO, dimetil sulfóxido; S, sacarosa; PVP, polivinil pirrolidona; Sí,a: citocalasina + centrifugación + pronasa; Sí,b: citocalasina; Sí,c: citocalasina + centrifugación.



**TABLA VII**

**CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS POR EL MÉTODO OPS DE VITRIFICACIÓN. DESARROLLO IN VIVO DE LOS EMBRIONES PORCINOS CONGELADOS/DESCONGELADOS DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA A LAS RECEPTORAS (ADAPTADO DE BERTHELOT ET AL., 2003)**

Estado embrionario	Concentración final del crioprotector (Moles)*	Tratamiento embrionario	Nº gestaciones/ Nº transferencias	Lechones nacidos/ embriones transferidos	Referencias
2-4 células					
Mórula	3,2 EG +2,5DMSO + 0,6 S	No	8/10	26/200	Berthelot et al. (2001a)
	8 EG + 7% PVP	Sí,a	3/4	16/115	Beebe et al. (2002)
Blastocistos	3,2 EG +2,5DMSO + 0,6 S	No	11/20	38/400	Berthelot et al. (2000b)
	3,2 EG +2,5DMSO + 0,6 S	No	8/10	59/200	Berthelot et al. (2001b)
	8 EG + 7% PVP	Sí,b	1/5	5/180	Cameron et al. (2000)
Blastocistos expandidos	3,2 EG +2,5DMSO + 0,6 S	No	0/11	0/257	Holm et al. (1999)
Blastocistos perieclósión					
Blastocistos eclosionados					

\*EG, Etilenglicol; DMSO, dimetil sulfóxido; S, sacarosa; PVP, polivinil pirrolidona; Sí,a: citocalasina + centrifugación + pronasa; Sí,b: citocalasina; Sí,c: citocalasina + centrifugación.

## CONCLUSIÓN

Aunque es claro que la criopreservación de los embriones porcinos es hoy una realidad y que alguna de las aplicaciones de esta tecnología puede ser utilizada en la actualidad (banco de genes), se necesitan realizar más investigaciones para aumentar los rendimientos del procedimiento en términos de fertilidad y prolificidad. El desarrollo de estas investigaciones deberán efectuarse de forma paralela a aquellas encaminadas a desarrollar un método no quirúrgico para transferir los embriones a las hembras receptoras (Martínez et al., 2003). En un futuro, la combinación de ambas tecnologías abrirán las puertas a la utilización práctica y comercial de la transferencia de embriones en la especie porcina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. Piglets born from vitrified zona-tact blastocysts. *Theriogenology* 2000; 53: 249.
2. Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Verral RG. Vitrification of zona pellucida intact embryos and birth of piglets using the Vit-Master. En 17th International Pig Veterinary Society Congress. Ames, Iowa, USA; 2002. pp. 64.
3. Berthelot F, Martinat-Botté F, Locatelli A, Terqui M. Coservation d'embryons porcins âgés de 5 à 6 jours en utilisant un méthode de refroidissement ultrara-



## CONGELACIÓN DE EMBRIONES PORCINOS

- pide: la Méthode Open Pulled Straw (OPS). *J. Recherche Porcine France* 2000a; 32: 433-7.
- Berthelot F, Martinat-Botté F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M. Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. *Cryobiology* 2000b; 41: 116-24.
  - Berthelot F, Martinat-Botté F, Perreau C, Terqui M. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage with intact zona pellucida. *Reproduction-Nutrition-Development* 2001a; 41: 267-72.
  - Berthelot F, Martinat-Botté F, Perreau C, Locatelli A, Manceau P, Terqui M. The use of an appropriate vitrification medium allows development of 30% of cryopreserved blastocysts and their birth as live piglets. *Piq News and Information* 2002; 23: 103-108.
  - Berthelot F, Martinat-Botté F, Perreau C, Terqui M. Birth of piglets after open pulled straw (OPS) vitrification and transfer of intact zona pellucida compacted morulae and unhatched blastocysts. In 6th International Conference on Pig Reproduction, Columbia, Mo. USA; 2001b. pp. 136.
  - Berthelot F, Martinat-Botté F., Vatja G., Terqui M. Cryopreservation of porcine embryos: state of the art. *Liv Prod Sci* 2003; 83: 73-83.
  - Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. Piglets born from vitrified early blastocysts using a simple technique, *Aust Vet J* 2000; 78: 195-6.
  - Cameron RDA, Lising R, Nagashima H, Blackshaw AW. Cryopreservation of cultured and uncultured porcine embryos with glycerol and trehalose. *Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society. The Hague, The Netherlands; 1992.* pp. 476.
  - Cuello C, Berthelot F, Martinat-Botté F, Venturi E, Vázquez JM, Roca J, Martínez E.A. Farrowing rate after non-surgical transfer of vitrified pig embryos. *Reproduction* 2002, abstract Series, 219, abstr. 52.
  - Dobrinsky JR. Cryopreservation of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1997; 52: 301-12.
  - Dobrinsky JR, Johnson LA. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of in vitro development. *Theriogenology* 1994; 42: 25-35.
  - Dobrinsky JR, Long CR, Johnson LA. Stability of microfilaments during swine embryo cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 47: 343.
  - Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of normal piglets after cytoskeletal stabilisation of embryos and cryoconservation by vitrification. *Theriogenology* 1998; 49: 166.
  - Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod* 2000; 62: 564-70.
  - Dobrinsky JR, Nagashima H, Pursel VG, Schreier L, Johnson LA. Cryoconservation of morula and early blastocysts stage swine embryos: Birth of litters after transfers. *Theriogenology* 2001; 55: 303.
  - Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 2002; 57: 285-302.
  - Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol, and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 2000; 15: 905-10.
  - Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-26.
  - Hazeleger W, Kemp B. State of the art in pig embryo transfer. *Theriogenology* 1999; 51: 81-90.
  - Holm P, Vajta G, Macchary Z, Schmidt M, Prather KS, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification of porcine blastocysts: simple procedure yielding excellent in vitro survival, but so far no piglets following transfer. *Cryo-Letters* 1999; 20: 307-10.
  - Fujino Y, Ujisato Y, Endo K, Tomizukz T, Kojima T, Oguri N. Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology* 1993; 30: 299-305.
  - Kashiwasaki N, Ohtani S, Nagashima H, Yamakawa H, Cheng WTK, Lin AC, Ma RCS, Ogawa S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Theriogenology* 1991; 35: 221.
  - Kobayashi S, Goto M, Kano M, Takei M, Minato K, Leibo SP. Farrows or pregnancies by transfer of porcine embryos vitrified at two institutions. *Cryobiology* 1998a; 36: 20-31.



26. Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* 1998b; 36: 20-31.
27. Kosarcic D, Veselinovic S, Ivkov V, Medic D, Micic R, Ivkov O, Kosarcic S. Transplantation of thawed deeply frozen embryos in swine. *Macedonian J Reprod* 1995; 1: 23-7.
28. Le Gal I, Deroover R, Verhaeghe B, Ltienne D, Massip A. Birth of calves from vitrified oocytes. *Ann Med Vet* 2000; 144: 33-6.
29. Leibo SPA. A one step method for direct non surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Int Congr Embryo Transfer Mammals* 1982; pp. 97, Annency, France.
30. Leibo SPA. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 767-90.
31. Martínez EA, Gil MA, Rieke A, Roca J, Vázquez JM, Didion BA, Day BN. Non-surgical deep intrauterine embryo transfer in sows. *Theriogenology* 2002; 57: 549 (abstr.).
32. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-69.
33. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247: 125-42.
34. Mazur P, Schneider U, Mahowald AP. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology* 1992; 29: 39-68.
35. Modl J, Reichenbach HU, Wolf E, Brem G. Development of frozen-thawed porcine blastocysts in vitro and in vivo. *Vet Rec* 1996; 139: 208-10.
36. Nagashima H, Cameron RDA, Kuwayama M, Young M, Beebe LFS, Blackshaw AW, Nottle MB. Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *J. Reprod. Dev.* 1999; 45: 167-76.
37. Nagashima H, Kashiwasaki N, Ashman R, Grupen C, Nottle M. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995; 374: 416.
38. Nagashima H, Kashiwasaki N, Ashman R, Grupen C, Seamark RF, Nottle M. Recent advances in cryo-preservation of porcine embryos. *Theriogenology* 1994a; 41: 113-8.
39. Nagashima H, Yamakawa H, Nieman H. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology* 1992; 37: 839-50.
40. Nagashima H, Kashiwasaki N, Ashman R, Grupen C, Seamark RF, Nottle M. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.* 1994b; 51: 618-22.
41. Polge C, Smith AU, Parks AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949, 164: 666.
42. Polge EJC, Wilmut IA, Rowson LEA. The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiology* 1974; 12: 551-60.
43. Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994; 41: 101-b.
44. Rall WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28: 237-45.
45. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
45. Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 68-78.
46. Vatja G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo-Lett* 1997; 18: 191-5.
47. Vatja G, Holm P, Booth PJ, Jacobson H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-8.
48. Vila L, García J. Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol* 1983; 5: 135-42.
49. Whittingham DG. Principles of embryo preservation: En "Low Temperature Preservation in Medicine and Biology". (M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant Eds.), P. Medical Liited, London; 1980. pp. 65-83.