

CONGELACIÓN DE EMBRIONES

Lino Andrés Oyuela DMV ULS
linodmv@hotmail.com

HISTORIA

- 1949 el equipo de Polge trabajando con semen bovino descubren el uso del glicerol.
- El equipo de Lovelock en 1959 el dimetilsulfoxido.
- 1972 Wilmut y Rowson y por Whittinghman, la congelación lenta.
- Congelación rápida

TIPOS DE CONGELACIÓN

- Congelación rápida
- Congelación lenta



CONGELACIÓN RÁPIDA

- Evitar la creación de cristales Intracelulares
- Vitrificación amorfa
- Solución a más de 6 molar



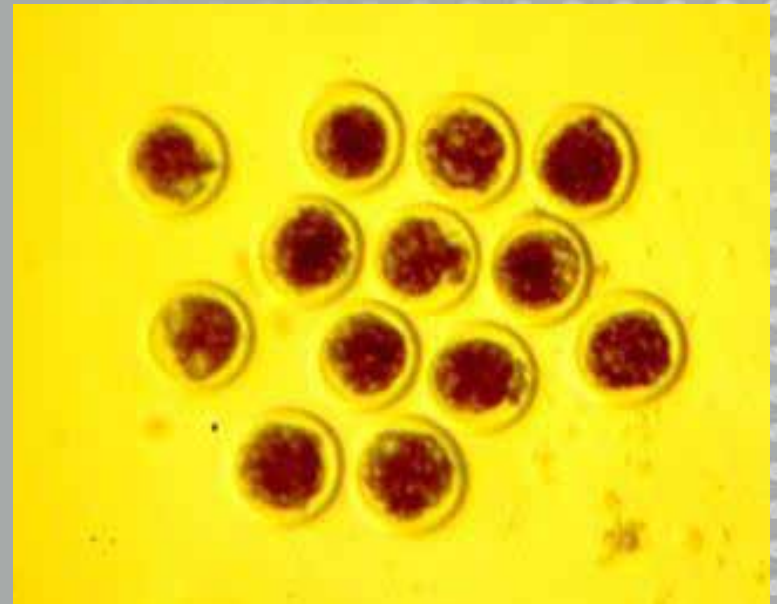
GENERALIDADES

- Ambiente limpio
- Condiciones ideales de asepsia
- Temperatura controlada entre 20 y 25



MANEJO DE LOS EMBRIONES

- Zona pelúcida intacta.
- Libres de detritos celulares.
- Lavados en solución con antibióticos y antimicóticos



CONGELACIÓN SIN CRIOPROTECTOR

- Formación de cristales
- Cristales de agua grandes
- Ruptura de membranas

FUNCIÓN DE CRIOPROTECTORES

- Evitar la formación de cristales intracelulares.
 - Glicerol (Glycerol) (Gly)
 - Etilen glicol (Etylen Glycol) (Ety)
- Altamente solubles
- Baja toxicidad
- Peso molecular que permita permeabilidad

CÉLULAS VIVAS

- El proceso de congelación de células vivas constituye un proceso complejo físico químico en el cual hay un movimiento de calor y agua entre la célula y el medio que la rodea. Existe una tasa de enfriamiento óptima para la permeabilidad del agua.

SEEDING

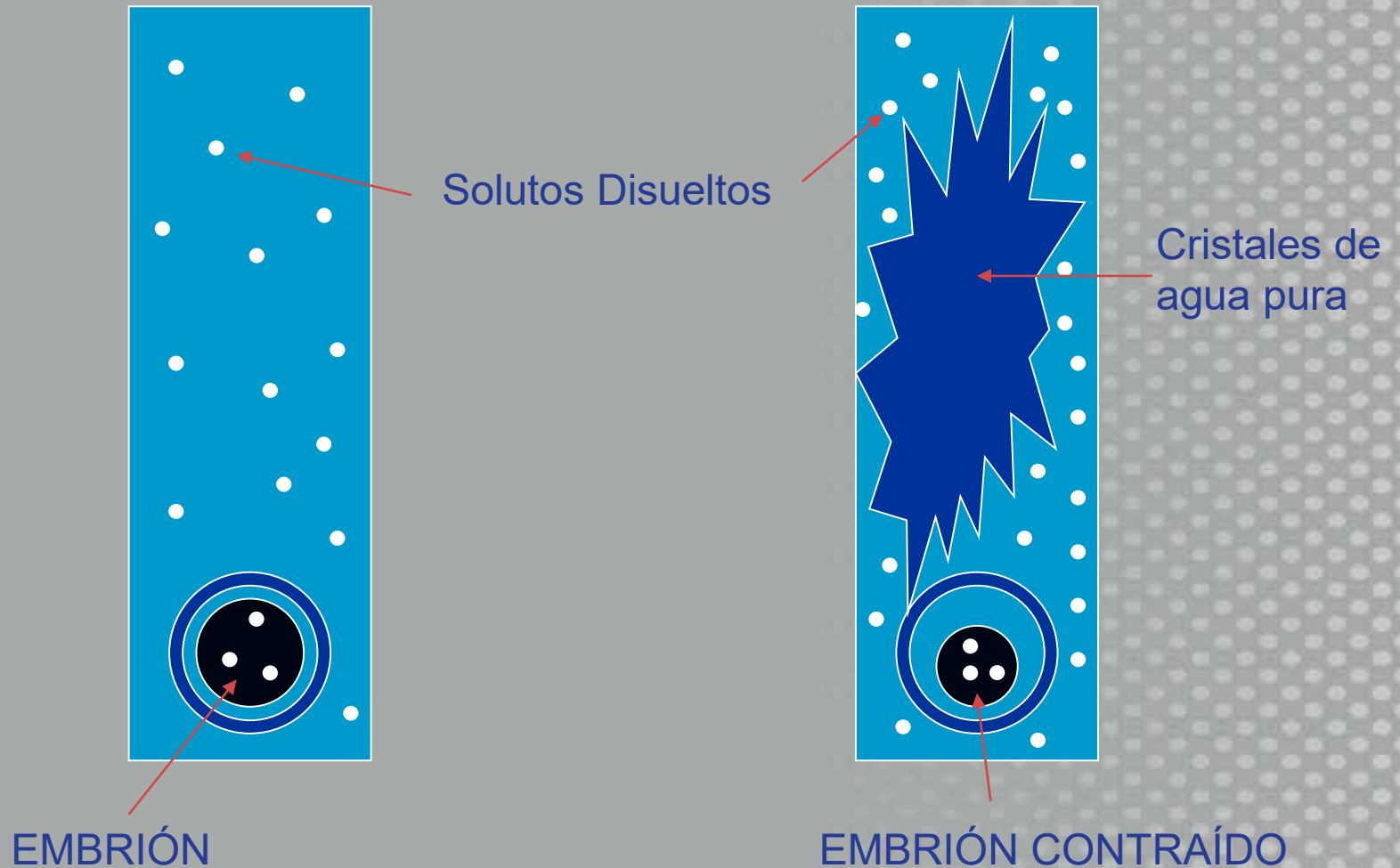
- Superenfriamiento,
- $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) hay formación repentina del hielo produciéndose un aumento brusco de temperatura denominado calor latente de fusión.
- Evitar el superenfriamiento: SEEDING, el agua de la célula y entre los cristales no se congela por los solutos que bajan su temperatura de cristalización

ENFRIAMIENTO PROGRESIVO

- Durante en enfriamiento progresivo los cristales de hielo se hacen cada vez mas grandes, la concentración del soluto aumenta y el embrión responde osmoticamente perdiendo agua. (Palma, 2001)



ENFRIAMIENTO PROGRESIVO



FORMACIÓN DE CRISTALES INTRACELULARES

- Durante la congelación
 - Tasa Ideal ($-0.5^{\circ} \text{ C/ minuto}$)
 - *Si es demasiado lento el crioprotector puede ser tóxico.

- Descongelación: Varía dependiendo del método de congelación
 - Muy rápida ($200^{\circ} \text{ C/min}$)
 - Lenta (20° C min)* muy poco usada

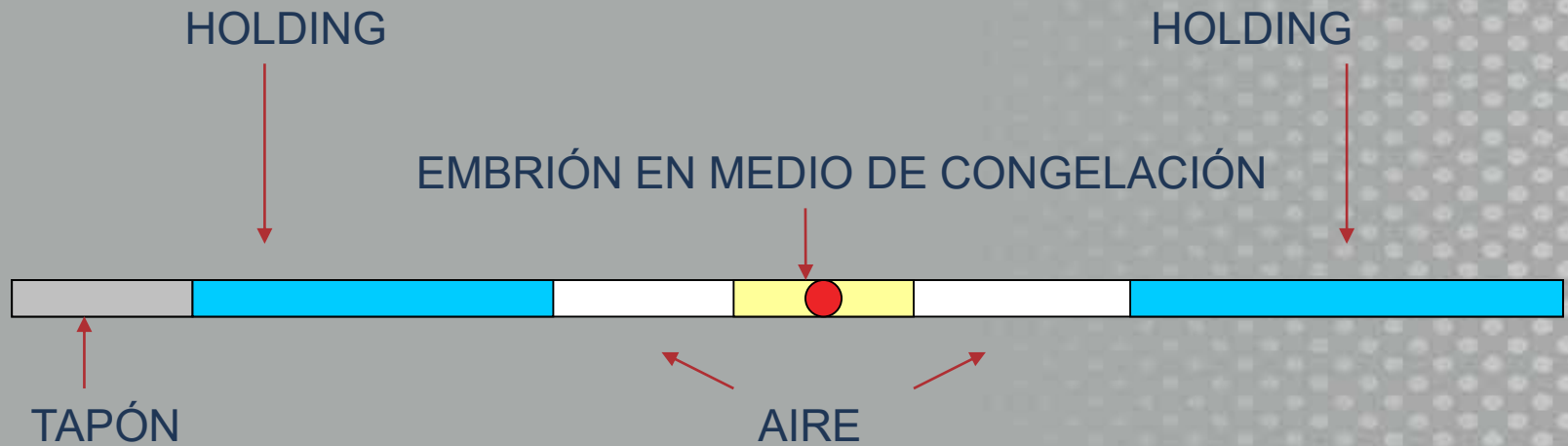
GLICEROL

- Es un molécula grande
- Adición ascendente
 - 5% + 0.3 sucrosa por 5 minutos
 - 10% + sucrosa por 15 minutos
- Descongelación en tres pasos
 - 5% + sucrosa
 - 2.5% + sucrosa
 - 0% + sucrosa

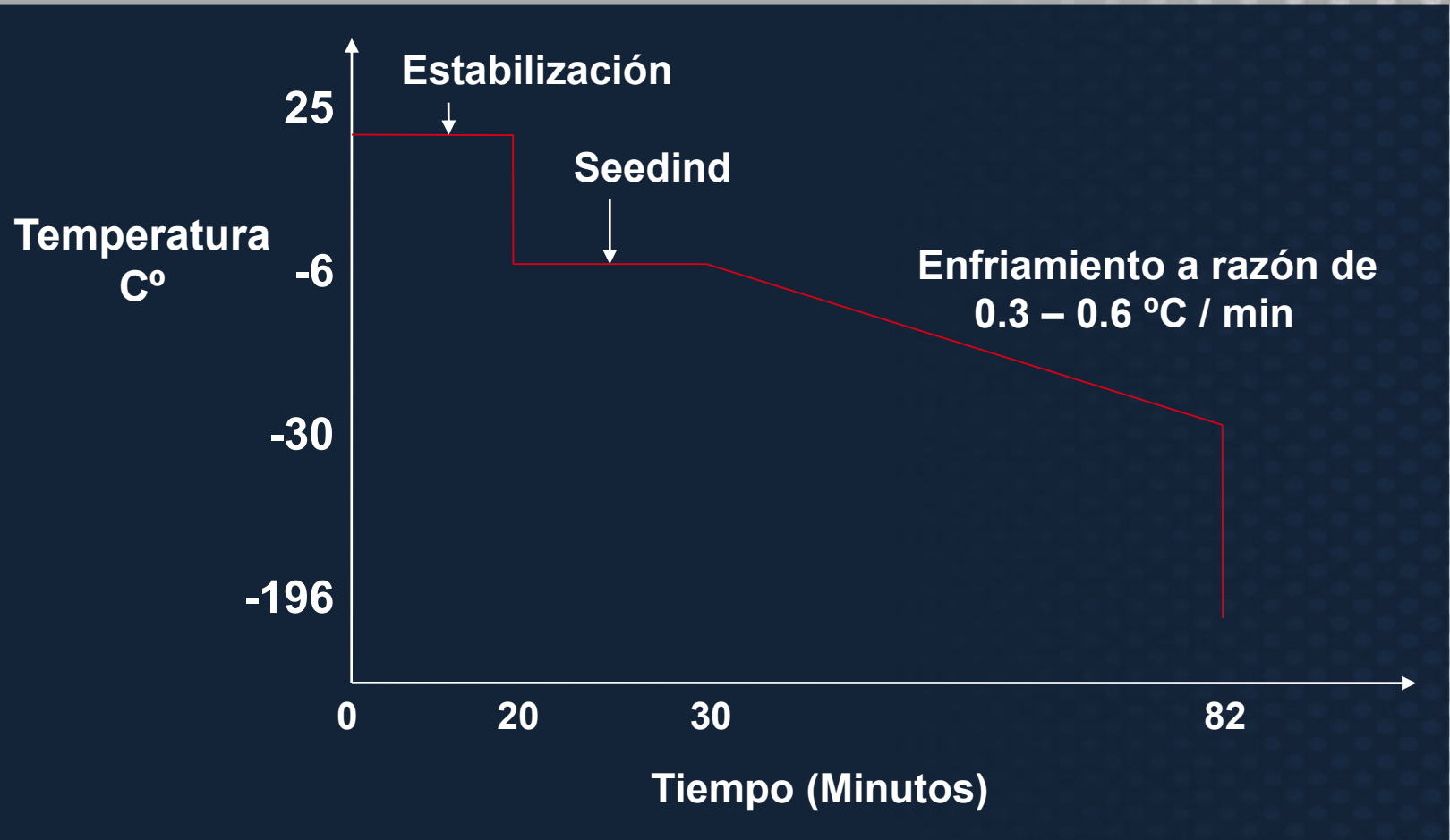
ETILEN GLICOL

- Un paso, molécula mas pequeña
- Mínimo 5 minuto y máximo 10 min.
- Transferencia directa sin remoción

FORMA DE LLENADO DE LA PAJILLA



CURVA DE ENFRIAMIENTO



CONGELACION EN GLICEROL

- GLY:
- Composición Vigro freeze plus
 - PBS DUBELCO MODIFICADO
 - 0,4% BSA
 - 0,1M SUCROSA
 - 10% GLICEROL
- PROTOCOLO:
 - 5 MIN 50% FREEZE PLUS + 50% HOLDING
 - 15 MIN 100% FREEZE PLUS
 - PAJILLA
 - CONGELADOR

- EMBRIONES DE EXPORTACION LAVADO CON TRIPSINA

CONGELACION ETILEN GLICOL

- ETHY
- Composición Vigro Ethylen Glycol Freeze Plus
 - 1,5M ETILEN GLICOL
 - 0,4% BSA
 - 0,1M SUCROSA
- PROTOCOLO
 - NO MENOS DE 5 MIN Y NO MAS DE 10 MIN EN 100% Vigro Ethylen Glycol Plus
 - PAJILLA
 - CONGELADOR

- EMBRIONES DE EXPORTACION LAVADO CON TRIPSINA

DESCONGELACIÓN:

■ ETHY

- MEDIO AMBIENTE POR 3 SEG
- AGUA A 30 °C POR 8 SEG
- TRANSFERENCIA DIRECTA

■ GLY

- MEDIO AMBIENTE POR 3 SEG
 - AGUA A 30 °C POR 8 SEG
 - ONE STEP POR 15 MIN
- “O”
- DESCONGELACIÓN EN TRES PASOS, 5 MIN CADA UNO

TRATAMIENTO CON TRIPSINA

- Paso 0 : Embriones en medio holding (lavados 5 veces)
- Paso 1 : Lavado del embrión en tripsina 0.25% (30 a 45 seg)
- Paso 2 : Segundo lavado tripsina 0.25% (30 a 45 segundos)
- Paso 3 : Hacer 5 lavados adicionales en Holding

IDENTIFICACIÓN IETS

- Método estandar mundial
- Marca en:
 - Tapón
 - Pajilla
 - Rótulo en pajilla de 0.5
- Amarillo para Etilen Glicol

NÚMERO ÚNICO DE PAJILLA

- Numero consecutivo de las misma colecta
- Incluirse en el certificado de congelación
- Etilen glicol debe anteponerse “DT”

UNIDAD BÁSICA

- Código de identificación del técnico/organización/equipo
- Código de dos letras indicando la raza
- Número de identificación (registro) de la hembra donante ejemplo:

Ejemplo

- **60107 BR 252 -4 245689**
 - 60107: código IETS de Embriogen LTDA
 - BR : Brahman
 - 252-4: Número de la vaca, tatuaje, nombre común o de establo
 - 245689: registro Asocebu

FECHA DE CONGELACIÓN

- La fecha de congelación es crítica para identificar embriones colectados de la misma donante en fechas diferentes
- DÍ / ME / AÑ ejemplo
01/EN/06
- AÑ/MO//DA Exportación (en ingles)
- 06/JA/01

NUMERO DE EMBRIONES

- Cada pajilla o vial debe mostrar el número de embriones que contienen, en el caso de contener más de un embrión. Cuando más de un embrión es congelado en una pajilla o vial, es necesario que en el informe de congelación se haga la anotación correspondiente con la calidad y descripción de cada uno

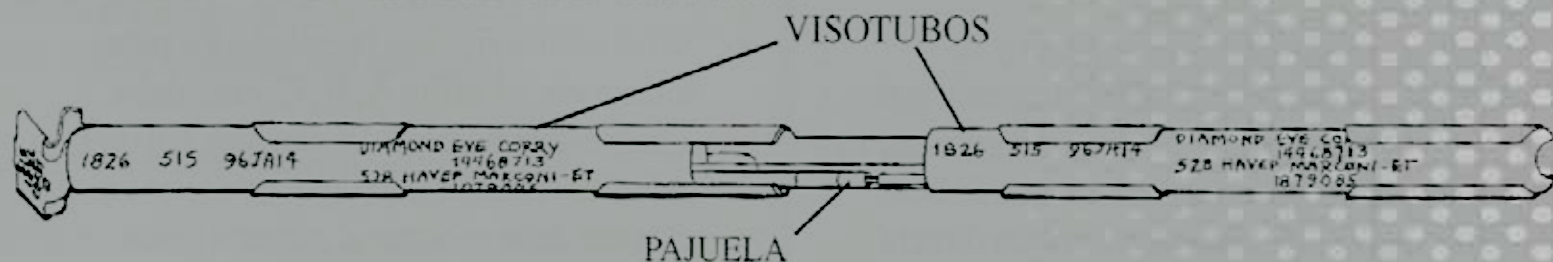
MARCACIÓN DE GOBLET

- Numero de la escalera que lo contiene
- Código de la IETS identificando al equipo/ veterinario/ tecnico/ organización que congelo los embriones
- Fecha de congelación día(dos digitos) /mes (dos letras)/año (dos digitos)
- Nombre y numero oficial de identificación de la donante
- Nombre oficial y numero de Semental

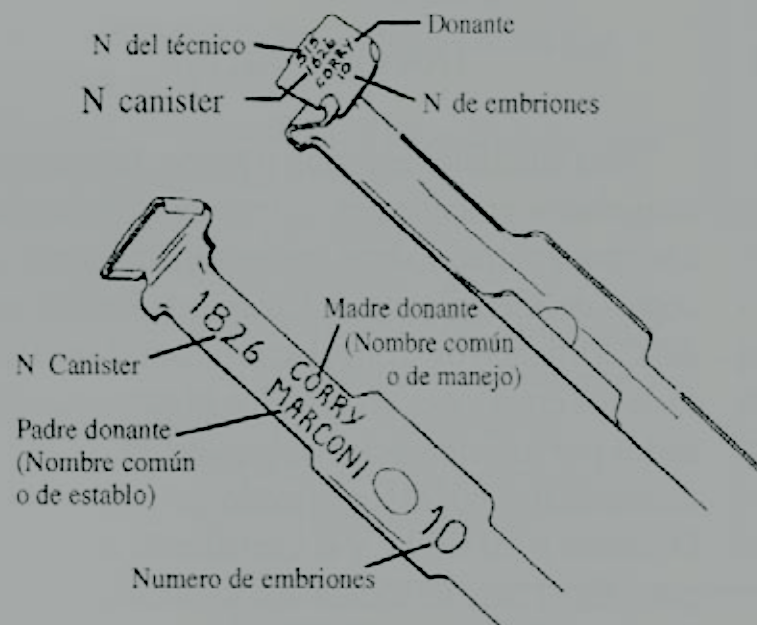
MARCADO DE LA ESCALERILLA

- Número único de escalerilla
- Nombre o numero de la hembra donante y del semental (completo o abreviado)
- Numero total de embriones que contiene
- Cada vez que se mueva de tanque la escalerilla deberá anotarse el sufijo A, B, C etc...

ENSAMBLAJE DE VISOTUBOS Y CANISTER

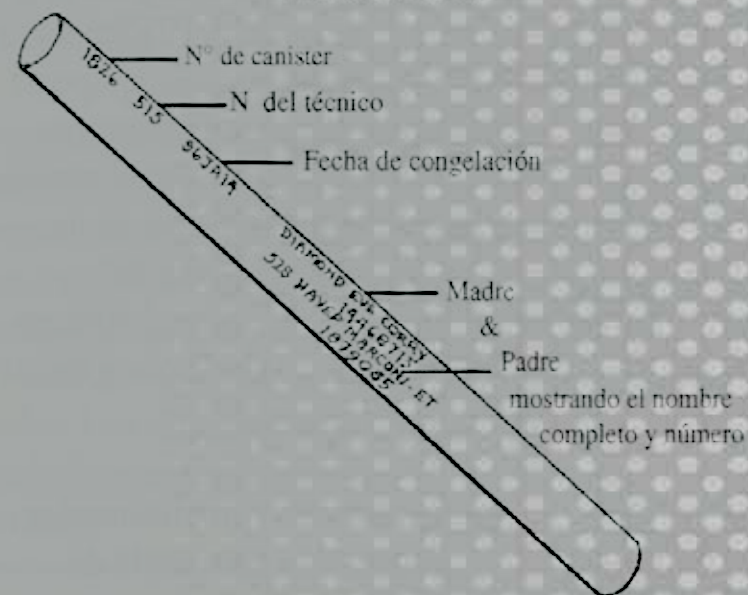


CABEZA DEL CANISTER



LATERAL DEL CANISTER

VISOTUBO



TRANSPORTE DE EMBRIONES

- La refrigeración es un método sencillo de criopreservación.
- Entre 0 y 4 °C por cortos periodos de tiempo (24 a 72 horas)

- Resultados obtenidos con la transferencia no quirúrgica de embriones refrigerados (Palma, 2001)

Tiempo de refrigeración	Embriones Transferidos	Receptoras Preñadas		Referencias
		n	%	
24 horas	19	9	47.3	Refsdal et al 1988
48 horas	16	8	50.0	Bezugly et al 1988
Hasta 72 hrs	222	98	44.1	Lindner et al 1985

CALIDAD DE LOS EMBRIONES A CONGELAR

- Se debe procurar siempre congelar embriones calidad 1 (excelente), considerar la posibilidad de congelar embriones grado 2 (regular) y definitivamente no congelar embriones grado 3 (malo).

Efecto de la calidad embrionaria pre-congelación sobre el porcentaje de preñez post-transferencia (Palma, 2001)

Calidad del Embrión	Embriones transferidos	Receptoras preñadas		Referencias
		n	%	
1 (excelente)	173	84	48.6	Leibo 1986
2 (regular)	220	98	44.6	
3 (malo)	83	20	24.1	
1 (excelente)	233	133	57.1	Arreseigor et al 1998
2 (regular)	276	146	52.9	
3 (malo)	276	86	31.2	
1 (excelente)	1633	996	61.0	Munar et al 1998
2 (regular)	565	301	53.3	
3 (malo)	123	49	39.8	

TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA COLECCIÓN Y EL CONGELAMIENTO

- El tiempo transcurrido entre la recolección de los embriones y el inicio del proceso de congelamiento es inversamente proporcional al resultado en preñeces

F.D. Jousan et al. / Theriogenology 61 (2004) 1193–1201

