



Reseña

**Estado actual de la congelación lenta y la vitrificación de embriones.
Perspectivas futuras**
Current status of slow freezing and vitrification of embryos. Future prospects

Helena Navarro Quevedo *

*Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical, La Habana, Cuba.
Correspondencia: hnavarroquevedo@gmail.com

Recibido: Diciembre, 2024; Aceptado: Enero, 2025; Publicado: Febrero, 2025.

RESUMEN

Antecedentes: La crioconservación de embriones es la tecnología que permite su almacenamiento a bajas temperaturas por periodos extensos de tiempo. Esta técnica posibilita la extensión de los programas de mejora genética y la conservación de razas y especies en peligro. **Objetivo.** Describir el estado actual de la congelación lenta y la vitrificación de embriones de interés ganadero y sus perspectivas futuras. **Desarrollo:** Debido a la demanda actual de la industria ganadera, es necesaria la aplicación de una técnica de crioconservación eficiente, sobre todo en aquellos embriones producidos *in vitro*, ya que poseen una menor criotolerancia. Los procesos más utilizados son la vitrificación y la congelación lenta son, aunque ambas técnicas poseen sus ventajas y limitaciones. **Conclusiones:** La vitrificación es una técnica económica y rápida, que evita los daños físicos provocados por la formación de los cristales de hielo; sin embargo, requiere de un mayor entrenamiento por parte del operador y no posee una alta estandarización como la congelación lenta. Además, la técnica de descongelación se adapta más a las condiciones de campo que la desvitrificación.

Palabras claves: congelación, crioconservación, embriones, ganadería, vitrificación (*Fuente: AGROVOC*)

ABSTRACT

Background: Cryopreservation of embryos is the technology that allows their storage at low temperatures for extended periods of time. This technique makes it possible to extend genetic improvement programs and conserve endangered breeds and species. **Objective.** Describe the current state of slow freezing and vitrification of embryos of livestock interest and its future perspectives. **Development:** Due to the current demand of the livestock industry, the application of an efficient cryopreservation technique is necessary, especially in those embryos produced in

Como citar (APA) Navarro Quevedo, H. (2025). Estado actual de la congelación lenta y la vitrificación de embriones. Perspectivas futuras. *Revista De Producción Animal*, 37. <https://apm.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e163>



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

vitro, since they have a lower cryotolerance. The most used processes are vitrification and slow freezing, although both techniques have their advantages and limitations. **Conclusions:** Vitrification is an economical and fast technique that avoids physical damage caused by the formation of ice crystals; However, it requires greater training on the part of the operator and does not have a high standardization like slow freezing. Furthermore, the thawing technique is more adapted to field conditions than devitrification.

Keywords: freezing, cryopreservation, embryos, livestock, vitrification (*Source: AGROVOC*)

INTRODUCCIÓN

Como resultado de los avances biotecnológicos y debido a la importancia económica que posee la ganadería, en el año 2020 se alcanzó una producción de cerca de 1,6 millones de embriones a nivel mundial; entre especies bovina, ovina, caprina, equina, cérvido y camélido. De los cuales, el 76,2% de los obtenidos en el ganado vacuno se produjeron in vitro; mientras que las cifras alcanzadas en otros grupos por esta técnica, se encuentran en ascenso (Viana, 2021). La crioconservación de estos embriones permite su almacenamiento sin que pierdan la capacidad de continuar su desarrollo, lo que posibilita la ejecución de programas de transferencia en gran magnitud y su comercio (Cabodevila y Teruel, 2001).

A pesar de la tendencia al incremento de los embriones producidos in vitro, en el año 2020 se observó una ligera disminución en cuanto a la crioconservación de estos. Esto se debe a las tasas relativamente bajas de supervivencia, en comparación a las reportadas por su contraparte in vivo (Viana, 2021). Por lo cual varios estudios se han enfocado en perfeccionar los protocolos de crioconservación vigentes.

Las tecnologías más utilizadas son la congelación lenta y la vitrificación, ambas técnicas poseen ventajas y limitaciones, y difieren en cuanto su aplicación en condiciones de campo, formación de cristales de hielo, estandarización de la técnica entre otros aspectos (Ferré, 2020). El objetivo de esta revisión es describir el estado actual de la congelación lenta y la vitrificación de embriones de interés ganadero y sus perspectivas futuras.

DESARROLLO

Crioconservación

La crioconservación es una tecnología que permite preservar órganos, tejidos y células, como son las células madres, células sanguíneas, espermatozoides, ovocitos y embriones de muchas especies. Además, posibilita el almacenamiento del material biológico por periodos extensos de tiempo a una temperatura de -196°C, a la cual el nitrógeno se encuentra en estado líquido (Pegg *et al.*, 2015). Varias fueron las investigaciones que intentaron la suspensión estructural y funcional de estos y su posterior restauración; sin embargo, esto no fue posible hasta que Polge *et al.* (1949) plantearon la inclusión de glicerol en el medio de la crioconservación.

El éxito de esta técnica radica en la habilidad de inducir y revertir, de una manera controlada, los cambios los que ocurren en las células a bajas temperaturas, minimizando los daños que ocurren durante este proceso (Bojic *et al.*, 2021). Estos procesos constituyen un desafío ya que provocan cambios mecánicos, tóxicos y osmóticos, que afectan la membrana celular, las mitocondrias, el retículo endoplasmático y la expresión genética, aumentando la muerte celular (Vining *et al.*, 2021; Valente *et al.*, 2022; Kurzella *et al.*, 2024). Cada tipo de célula posee un conjunto de condiciones óptimas determinadas por la interacción de las propiedades particulares de la célula en cuestión con los factores criobiológicos (Pegg, 2015).

En el caso de los embriones, por ejemplo, la ocurrencia de apoptosis como respuesta al estrés celular influye negativamente en la habilidad posterior del embrión para eclosionar, debido a que la expansión del blastocelo se encuentra relacionado con el número total de células que conforman el embrión (Santana *et al.*, 2020). Aunque, un adecuado protocolo de descongelación o desvitrificación, tiene como resultado la regeneración y reorganización celular de las estructuras embrionarias (Estudillo *et al.*, 2021).

La criopreservación de embriones permite la mejora genética posibilita controlar enfermedades al reemplazar la importación de animales y el uso eficiente de donantes y receptoras, al otorgar una mayor flexibilidad en la disponibilidad de estas últimas (Cabodevila y Teruel, 2001). Además, permite el establecimiento de bancos de germoplasma dedicados a la conservación de razas y especies que se encuentran en peligro de extinción (Blackburn *et al.*, 2023).

Dentro de las técnicas de criopreservación de embriones se encuentran la congelación lenta, la vitrificación y la congelación ultrarrápida. Esta última es similar a la vitrificación, pero se produce cristalización intra y extracelular. Otra técnica empleada es la refrigeración, la cual consiste en el mantenimiento de los embriones a temperaturas entre 0 y 4°C hasta 72 horas, por lo cual no se considera crioconservación, sino una técnica intermedia entre esta y la transferencia en fresco. La congelación lenta y la vitrificación son los dos procesos más empleados (Cabodevila y Teruel, 2001).

Congelación lenta

En la técnica congelación lenta, también denominada congelación convencional, los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura y lo mantienen durante el enfriamiento. Este equilibrio se lleva a cabo lentamente, permitiéndole a los embriones contraerse y ceder agua en respuesta al incremento de la concentración de la solución extracelular producto de la adición de crioprotectores (Cabodevila y Teruel, 2001).

Los crioprotectores incrementan la concentración de solutos del sistema y producen la salida de agua intracelular, lo que permite reducir la formación de hielo y estabilizar las membranas celulares. Estos son sustancias de bajo peso molecular y solubles en agua, las cuales se clasifican en intracelulares cuando pueden penetrar la membrana plasmática (glicerol, dimetilsulfóxido,

etanodiol, propanodiol, etilenglicol), o extracelulares (azúcares y otras moléculas sintéticas) (Pegg, 2015).

Whittingham *et al.* (1972) fueron los primeros en realizar la congelación exitosa de embriones y obtener gestaciones. Los autores sometieron embriones de ratón a soluciones con base de PBS (solución buffer fosfato) con presencia de dimetilsulfóxido o glicerol. La disminución de la temperatura se realizó mediante la utilización de hielo, induciendo la cristalización, y posteriormente descendieron gradualmente durante periodos de tiempo determinados hasta su introducción en nitrógeno líquido.

Este protocolo, denominado también método estándar, varía de los protocolos actuales, modificando el uso de crioprotectores y velocidades de enfriamiento, incluido el paso de seeding; el cual se realiza entre -4 y -7°C, tocando el envase de los embriones con una pinza enfriada previamente a -196°C, induciendo la formación de hielo extracelular. El método de congelación fue posteriormente simplificado con la inclusión de equipos programables (Cabodevila y Teruel, 2001).

Varios son los crioprotectores empleados, variando entre la especie y el protocolo a utilizar. Whittingham *et al.* (1972) al trabajar con embriones murinos obtuvieron una mayor tasa de supervivencia para aquellos tratados con dimetilsulfóxido. Mientras que Barba (2016) obtuvo un mejor resultado con etilenglicol en embriones de ovino, bovino y caprino, respectivamente.

La utilización de protocolos con etilenglicol o glicerol con sacarosa en bovino han permitido la implementación de la transferencia directa, una técnica ampliamente utilizada en condiciones de granja. Con este método es posible obtener altas y consistentes tasas de gestación (Dochi, 2019). Monosacáridos y disacáridos son usados frecuentemente como crioprotectores extracelulares, sin embargo, la sacarosa y la trealosa son los más comúnmente utilizados (Rajan y Matsumura, 2018). También son empleadas macromoléculas sintéticas como el ácido hialurónico y el polivinilpirrolidona, las cuales garantizan condiciones de congelación químicamente definidas (Barba, 2016). Estos medios también pueden ser suplementados con ascorbato, el cual reduce los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno y la fragmentación del ADN (Carrascal *et al.*, 2022).

La aplicación los crioprotectores se encuentra limitada principalmente por su toxicidad, por lo cual una de las principales tendencias en los últimos años fue la investigación de proteínas anticogelantes, una familia de biomoléculas producidas de forma natural por varios organismos, como levaduras, insectos y peces, para sustentar la vida en ambientes extremadamente fríos (Ekpo *et al.*, 2022). La extracción y síntesis de estas moléculas, y su posterior uso como crioprotectores demostró su efectividad en semen (Jang *et al.*, 2020) y ovocitos bovinos (Sun *et al.*, 2020), así como en embriones de oveja (Li *et al.*, 2020; Correia *et al.*, 2024) por lo que el uso de biomoléculas en la crioconservación de embriones de diferentes especies en se considera una perspectiva prometedora.

Los protocolos de congelación lenta poseen una alta estandarización, son los más utilizados industrial y comercialmente. Este método permite mitigar el efecto de los factores que causan daño celular, como son la toxicidad, los daños mecánicos, osmóticos y la formación de cristales de hielo. Este último, con la evolución de los protocolos, fue minimizado a niveles aceptables o eliminado completamente (Vajta y Kuwayama, 2006).

Vitrificación

En la vitrificación es la técnica en la cual el fluido pasa a un estado sólido viscoso no estructurado similar al vidrio, por la cual adquiere su denominación; a diferencia de lo que ocurre en la congelación, donde se forman cristales de hielo. Se efectúa una deshidratación parcial de los embriones sin que estos alcancen su equilibrio osmótico (Cabodevila y Teruel, 2001).

Rall y Fahy (1985) reportaron la primera vitrificación exitosa de embriones de mamífero. Los autores equilibraron embriones murinos en una solución vitrificante; los cuales fueron sometidos por cortos períodos de tiempo a diferentes porcentajes de la solución, en orden creciente, hasta observar la reducción del volumen de las células al microscopio producto a la deshidratación. Este medio se formuló a partir de una solución salina, la cual fue modificada con dimetilsulfóxido, acetamida, propilenglicol y polietilenglicol. Este trabajo demostró que las concentraciones de los crioprotectores debían ser altas, ya que, cuando se utilizaron menores concentraciones se obtuvo tasas más bajas de sobrevivencia embrionaria, producto de la formación de cristales de hielo extra e intracelular.

Una desventaja que posee la vitrificación es que estas altas concentraciones crioprotectores ejercen efectos citotóxicos, aun cuando los protocolos de vitrificación están diseñados para minimizar el tiempo de exposición del blastocisto a estos compuestos (Fryc *et al.*, 2022). Aunque este efecto puede ser minimizado por una adecuada selección y combinación de crioprotectores, los cuales varían según el protocolo a utilizar (Souza *et al.*, 2018), o la aplicación de sustancias de origen natural como las proteínas anticogelantes.

Entre los intracelulares más empleados encontramos el dimetilsulfóxido y el etilenglicol (Souza *et al.*, 2018; Gómez *et al.*, 2020; Najafzadeh *et al.*, 2021). Mientras que, los azúcares destacan como los crioprotectores extracelulares más empleados. Estos, al ser no penetrantes causan un gradiente osmótico que reduce el contenido de agua intracelular, y consecuentemente minimiza la formación de cristales de hielo en el interior de la célula (Rall, 1987). Entre los azúcares utilizados se encuentra la glucosa y la sacarosa, que la sucrosa es más efectiva; altas concentraciones de etilenglicol y dimetilsulfóxido combinadas con sucrosa protegen al embrión durante el proceso de vitrificación, que la utilización de bajas concentraciones de estos crioprotectores extracelulares sin presencia del azúcar (Souza, *et al.* 2018).

La vitrificación regula el alza de los genes que mejoran la criotolerancia, pero al mismo tiempo podría desregular los genes que se requieren de manera crítica para la implantación embrionaria,

la función placentaria, la diferenciación celular y el éxito de la gestación. Además, podría verse afectado los mecanismos epigenéticos que regulan las vías apoptóticas y necróticas más adelante en el desarrollo fetal, comprometiendo la supervivencia posterior a la transferencia de embriones vitrificados (Arshad *et al.*, 2021). Estudios realizados en embriones ovinos vitrificados reportaron altas de recuperación de blastocistos; sin embargo, estos poseían un menor número de blastómeros que su contraparte no vitrificada (Fryc *et al.*, 2022).

Knetter (2023) plantea que una misma especie puede mostrar diferentes porcentajes de criotolerancia en dependencia del estadio de desarrollo en que se encuentre. Afirma que los estadios con menor número de células requieren protocolos de vitrificación con una mayor velocidad de enfriamiento. Otro factor que afecta el éxito de la técnica es la selección del dispositivo de vitrificación donde se cargan los embriones; esta no es una decisión trivial, la cual puede llegar a influir en la tasa de supervivencia de blastocistos y en variaciones fenotípicas postnatales (Kim *et al.*, 2020; Garcia *et al.*, 2020).

Los dispositivos utilizados se clasifican en totalmente abiertos en los casos en que la muestra entra en contacto directo con el nitrógeno líquido durante todo el procesamiento y almacenamiento. Abiertos de almacenamiento cerrado, cuando estos disponen de un contenedor adicional que pueda sellarse antes del almacenamiento, de modo que la muestra está en contacto directo con el nitrógeno líquido durante el procedimiento, pero no posteriormente. Se denominan semicerrados, si la muestra entra en contacto con los vapores de nitrógeno; cerrados, si el soporte es abierto y el contenedor es sellado antes del contacto con el nitrógeno líquido; y por último se encuentran las pajuelas selladas (Vajta *et al.*, 2015).

En experimentos realizados en conejo se encontraron tasas de desarrollo similares entre embriones frescos y vitrificados en dispositivos Cryotop, un dispositivo abierto que carga menos de 1 µL de medio de vitrificación, que en aquellos embriones vitrificados minipajuelas de vitrificación (0,125 mL de medio de vitrificación) (Garcia *et al.*, 2020). Oliveira *et al.* (2020) plantean que un dispositivo de vitrificación abierto tiene la ventaja que posibilita calentar directamente en la pajuela de transferencia.

Investigaciones recientes han demostrado que la aspiración del fluido presente en el blastocelo, y el consecuente colapso del embrión, antes de realizar el proceso de vitrificación incrementa significativamente las tasas de supervivencia (Umair *et al.*, 2023; Martínez *et al.*, 2024).

Transferencia de embriones criopreservados

La descongelación y la desvitrificación constituyen los procesos inversos a la congelación y la vitrificación, respectivamente; en los cuales los embriones criopreservados son llevados a las temperaturas fisiológicas. Si estos procedimientos se hacen incorrectamente pueden dar lugar a cristales de hielos o los existentes sufrir un crecimiento adicional, provocando un daño mecánico que compromete la vida celular (Cabodevila y Teruel, 2001).

La velocidad de descongelación está determinada por la temperatura a la que se detuvo la congelación lenta de los embriones antes de ser inmersos en el nitrógeno líquido. Posteriormente a este paso, se realiza la extracción del crioprotector en tantos pases por gotas de medio como sean necesarios o se realiza la transferencia directa, en dependencia de los reactivos y el protocolo utilizado durante la congelación (Cabodevila y Teruel, 2001).

Un aspecto negativo de la transferencia directa es que al prescindir de la evaluación morfológica las tasas de gestación obtenidas suelen ser menores (Cabodevila y Teruel, 2001). No obstante, la mayor ventaja que posee es la implantación de un mayor número de embriones en menor número de tiempo, y disminuye la interferencia en la producción de leche. Los métodos de transferencia no directos requieren de equipamiento, un área de laboratorio apropiada y consume más tiempo (Dochi, 2019)

En el caso de la desvitrificación de los embriones almacenados en pajuelas, se realiza sumergiendo las pajuelas en agua a 37°C y luego se sumergen en el medio de medio de desvitrificación (Vajta *et al.*, 2015). En el resto de sistemas de vitrificación se coloca la punta del dispositivo, removiendo previamente el contenedor en los casos en los que los requiera, directamente sobre una gota del medio apropiado para recuperar los embriones (Canesin *et al.*, 2020).

Los protocolos de desvitrificación requieren que los embriones sean lavados sucesivamente en diferentes soluciones con el fin de que el embrión se reexpanda, se extraigan las altas concentraciones de crioprotectores, lo que puede causar un choque osmótico y afectar su sobrevivencia, y su evaluación antes de ser transferidos. Además, esto provoca que el proceso de transferencia consuma mayor tiempo (Loutradi *et al.*, 2008).

Oliveira *et al.* (2020) plantearon un método de transferencia directa para la vitrificación, en el que se utiliza un dispositivo abierto, el cual es introducido con la ayuda de un adaptador en una pajuela en la que se encuentran columnas con diferentes concentraciones de medio para su desvitrificación. Aunque obtienen bajas tasas de gestación, se considera este protocolo prometedor y todavía se encuentra en perfeccionamiento.

La adición de soluciones con presencia de azúcares en el medio de descongelación o desvitrificación es beneficiosa para el desarrollo posterior del embrión. Esto se debe a sus características no penetrantes, que permiten su uso de manera efectiva en la extracción de agentes crioprotectores altamente concentrados en los blastómeros independientemente de cual sea el crioprotector intracelular utilizado (Schiewe *et al.*, 2020).

Schiewe *et al.* (2020) informaron que un producto natural, como la miel, compuesto predominantemente de fructosa y glucosa, es una opción eficiente, de bajo costo y fácilmente disponible para cualquier laboratorio en todo el mundo para extraer de forma segura crioprotectores potencialmente tóxicos de las células antes de su transferencia.

El uso como crioprotector de la melatonina, una hormona con efecto antioxidante, se comenzó a investigar en los últimos años. Estudios han determinado sus propiedades reguladoras del estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN durante la vitrificación de embriones; así como aditivo en el medio de desvitrificación (Marcantonini *et al.*, 2022; Choi y Jang, 2022; Li *et al.*, 2023). Además, la melatonina regula la expresión de genes que son necesarios en la futura implantación del embrión (Ivanov *et al.*, 2021).

Experimentos recientes encaminan las investigaciones al uso de nanomateriales para la administración de crioprotectores aumentando su penetración y disminuyendo la toxicidad de estos. Además, el uso de nanopartículas magnéticas demostraron una influencia positiva durante la desvitrificación, evitando la formación de cristales de hielo durante este proceso (Jones *et al.*, 2021; Choi y Jang, 2022; Wang *et al.*, 2024; Doultani *et al.*, 2024)

¿Congelación lenta o vitrificación?

De acuerdo con el reporte de la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) efectuado en el año 2021, aunque existe una tendencia en los últimos años a la reducción de embriones obtenidos por colecta, un gran número de estos (58,4% del total de los producidos por esta técnica) fueron transferidos luego de su crioconservación. Mientras que, del total de embriones producidos in vitro que se transfirieron solamente un 39,5% fueron embriones crioconservados. Esto se debe a que la colecta de embriones es usada como una alternativa en situaciones que requieran crioconservación, para compensar la baja criotolerancia de los embriones producidos in vitro (Viana, 2021), por lo que la elección del método de crioconservación adecuado en esta biotecnología adquiere importancia.

La vitrificación tiene la ventaja de minimizar las lesiones por las bajas temperaturas debido a que pasa rápidamente por las temperaturas críticas. Además, evita el daño físico por la formación de cristales de hielo, una de las principales causas del daño físico a los embriones (Rall y Fahy, 1985). De esta manera protege temporalmente a una mayor proporción de embriones del estrés por los daños ocurridos durante la crioconservación, lo que da como resultado una mayor reexpansión embrionaria, eclosión y supervivencia in vitro que el procedimiento congelación lenta. Sin embargo, este mayor desarrollo embrionario in vitro no se acompaña siempre de una mayor supervivencia embrionaria después del proceso de transferencia (Arshad *et al.*, 2021).

La vitrificación es descrita como un método simple, el factor que más influye en un método de vitrificación exitoso es la habilidad y destreza del operador. A diferencia de la congelación lenta, la vitrificación no requiere de equipos programables que promueven la estandarización del proceso (Do y Taylor-Robinson, 2019). Sin embargo, esta técnica no permite el procesamiento de altos volúmenes de embriones debido a los múltiples pasos de equilibrio que requiere. Otra desventaja que posee es que los métodos actuales de desvitrificación y los dispositivos existentes no son compatibles con la transferencia directa, tan usada en el método de congelación lenta (Ferré, 2020).

La amplia variedad de protocolos de vitrificación, es otro aspecto a considerar, ya que estos que difieren en los tiempos utilizados, temperaturas y la variación de los crioprotectores; además el operador puede elegir entre soportes de vitrificación diferentes (pajuelas, microgotas, cryotop, cryohook, entre otros sistemas). El tamaño de la gota también varía, lo que afecta las tasas de enfriamiento y desvitrificación del medio (Vajta *et al.*, 2015). Por lo tanto, se considera que, aunque la vitrificación es una técnica ampliamente estudiada, aún no se ha conseguido estandarizar sus procedimientos, lo que constituye un inconveniente para su aplicación en la producción in vitro de embriones y en la comercialización de estos (Do *et al.*, 2020)

Aunque, recientemente se ha desarrollado un dispositivo automático para vitrificar ovocitos y embriones. Este equipo es capaz de transportar las muestras biológicas, previamente cargadas en pajuelas, entre las diferentes soluciones de vitrificación y equilibrio en intervalos de tiempo predeterminado, y finalmente sumergirlas en nitrógeno. También realiza el proceso de desvitrificación (Arav *et al.*, 2018).

La calidad de los embriones es otro factor a tomar en cuenta al elegir el método de crioconservación a utilizar. El alto contenido de lípidos en los embriones producidos in vitro durante el periodo de cultivo es uno de los factores que influyen en la criotolerancia (Bradley y Swann, 2019), por lo que se considera en estos casos la vitrificación una técnica más adecuada que la congelación lenta. Esto se expresa en mayores tasas de supervivencia embrionarias (Bharti *et al.*, 2022). Sin embargo, estudios recientes se han enfocado en reducir la sensibilidad de estos embriones adaptando las condiciones de cultivo para reducir la acumulación de lípidos en el citoplasma mediante modificaciones en los medios de cultivo in vitro (de Camargo *et al.*, 2022) o delipidación (Wu y Cheong, 2023). Najafzadeh *et al.* (2021) y Gonzalez *et al.*, (2022) también plantean que la vitrificación es la alternativa más adecuada que la congelación en embriones sometidos a biopsia.

CONCLUSIÓN

La congelación lenta y la vitrificación son técnicas ampliamente utilizadas en la crioconservación de embriones. Aunque son varios los autores que se decantan por la vitrificación, por ser es una técnica económica y rápida, que evita los daños físicos provocados por la formación de los cristales de hielo; esta requiere de un mayor entrenamiento por parte del operador y no posee una alta estandarización como la congelación lenta. Además, la técnica de descongelación se adapta más a las condiciones de campo que la desvitrificación. Investigaciones recientes se enfocan en la solución de las principales limitaciones de estas técnicas, enfocándose fundamentalmente en la sustitución de crioprotectores por sustancias de menor citotoxicidad.

La idoneidad de un método u otro varía según la especie a trabajar, las condiciones de trabajo y los protocolos utilizados para la obtención de los embriones, queda a decisión del investigador encontrar la técnica óptima para su laboratorio.

REFERENCIAS

- Arav, A., Natan, Y., Kalo, D., Komsky-Elbaz, A., Roth, Z., Levi-Setti, P. E., Leong, M., & Patrizio, P. (2018). A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(7), 1161-1168. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1210-9>
- Arshad, U., Sagheer, M., González, F. B., Hassan, M., & Sosa, F. (2021). Vitrification improves *in-vitro* embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. *Cryobiology*, 101, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.06.007>
- Barba, M. E. (2016). Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos *in vitro* en medios sintéticos. (Tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuenca, Ecuador. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26153>
- Bharti, A. V., Layek S. S., Raj, S., Gorani, S., & Doultani, S. (2022). Vitrification of bovine *in vitro*-produced embryos: can it replace slow freezing in bovines? *Reproduction, Fertility and Development*, 35(2), 146-146. <https://doi.org/10.1071/RDv35n2Ab41>
- Blackburn, H. D., Costa, H., Purdy, P. H. (2023). Incorporation of Biotechnologies into gene banking strategies to facilitate rapid reconstitution of populations. *Animals*, 13(2)0. <https://doi.org/10.3390/ani13203169>
- Bojic, S., Murray, A., Bentley, B., Spindler, R., Pawlik, P., Cordeiro, J. L., Bauer, R., & Magalhães. (2021). Winter is coming: The future of cryopreservation. *BMC Biology*, 19(52). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>
- Bradley, J., & Swann, K. (2019). Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *The International Journal of Developmental Biology*, 63, 93–103. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180355ks>
- Cabodevila, J., & Teruel, M. (2001). Criopreservación de embriones bovinos. En: Palma, G.A (ed.) *Biotecnología de la reproducción*. Balcarce, Ediciones INTA. 149-174.
- Canesin, H. S., Ortiz, I., Filho, A. N. R., Salgado, R. M., Brom-de-Luna, J. G., & Hinrichs, K. (2020). Effect of warming method on embryo quality in a simplified equine embryo

- vitrification system. *Theriogenology*, 151, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.012>
- Carrascal, E. L., Moreira, A., Ruiz, A., Penitente, J. M., Hansen, P. J., Torres, C. A., & Block, J. (2022). Effect of addition of ascorbate, dithiothreitol or a caspase-3 inhibitor to cryopreservation medium on post-thaw survival of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(9), 1074-1081. <https://doi.org/10.1111/rda.14182>
- Choi, H. W., & Jang, H. (2022). Application of nanoparticles and melatonin for cryopreservation of gametes and embryos. *Current Issues in Molecular Biology*. 44(9), 4028-4044. <https://doi.org/10.3390/cimb44090276>
- Correia, L. F. L., Leal, G. R., Brandão, F. Z., Btista, R. I. T. P., & Souza, J. M. G. (2024). Effect of antifreeze protein I in the freezing solution on *in vivo*-derived sheep embryos. *Research in Veterinary Science*, 168, 105-132. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105132>
- de Camargo, J., Rodrigues, R., Santana, R., Borba, D., Aparecida, A., Anacleto, K. R., Camponogara, R., Basso, A. C., Nogueira, M., Kubo, P., Gouveia, M. F., & Sudano, M. J. (2022). Evaluation of serum-free culture medium for enhanced vitrification cryosurvival of bovine *in vitro*-derived embryos. *Livestock Science*, 260, 1871-1413. <https://doi.org/10.1016/j.lisci.2022.104922>
- Do, V. H., Catt, S., Kinder, J. E., Walton, S., & Taylor-Robinson, A.W. (2019). Vitrification of *in vitro*-derived cattle embryos: targeting enhancement of quality by refining technology and standardizing procedures. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(5), 837-846. <https://doi.org/10.1071/RD18352>
- Do, V.H., & Taylor-Robinson, A. H. (2020). Cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos by vitrification: In pursuit of a simplified, standardized procedure that improves pregnancy rates to promote cattle industry use. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 36(3), 251-270. <https://doi.org/10.2298/BAH2003251H>
- Dochi, O. (2019). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *Journal of Reproduction and Development*, 65(5). 389-396. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-025>
- Doultani, S., Sharma, P., Patel, M., & Saripadiya, B. (2024). Emerging trends in cryopreservation techniques for bovine embryos: Advancements and applications. *International Journal of Creative Research Thoughts*, 12(9), 1-11.
- Ekpo, M. D., Xie, J., Hu, Y., Liu, X., Liu, F., Xiang, J., Zhao, R., Wang, B., & Tan, S. (2022). Antifreeze proteins: Novel applications and navigations towards their clinical application

- in cryobanking. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2639. <https://doi.org/10.3390/ijms23052639>
- Estudillo, E., Jimenez, A., Bustamante-Nieves, P. E., Palacios-Reyes, C., Velasco, I., & Lopez-Ornelas, A. (2021). Cryopreservation of gametes and embryos and their molecular changes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910864>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Taiyeb, A. M., Campos, F., & Ross, P.J. (2020). Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, 55, 659-676. <https://doi.org/10.1111/rda.13667>
- Fryc, K., Nowak, A., Kij-Mitka, B., Kochan, J., Bartlewski P. M., & Murawski, M. (2022). Morphokinetic changes in vitrified and non-vitrified *in vitro*-derived ovine embryos. *Theriogenology*, 187, 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.04.027>
- Garcia, X., Vicente, J. S., & Francisco, M. (2020). Developmental plasticity in response to embryo cryopreservation: The importance of the vitrification device in rabbits. *Animals*, 10(804), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ani10050804>
- Gómez, E., Carrocera, S., Martín, D., Pérez, J. J., Prendes, J., Prendes, J. M., Vázquez, A., Murillo, A., Gimeno, & Muñoz, M. (2020). Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured *in vitro* and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology*, 146, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.056>
- Gonzalez, N., Martínez, I., Schezer, J., Jung, S., Reichenbach, M., Zablotski, Y., Otzdorff, C., Zerbe, H., & Morgas, T. (2022). Vitrification and in-straw warming do no affect pregnancy rates of biopsied bovine embryos. *Theriogenology*, 191, 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.07.021>
- Ivanov, D., Mazzocchi, G., Anderson, G., Linkova, N., Dyatlova, A., Mironova, E., Polyakova, V., Kvetnoy, I., Evsyukova, I., Carbone, A., & Nasyrov, R. (2021). Melatonin, its beneficial effects on embryogenesis from mitigating oxidative stress to regulating gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms2211585>
- Jang, H., Kwon, H. J., Sun, W. S., Hwang, S., Hwang, I. J., Kim, S., Lee, J. H., Lee, S. G., & Lee, J. W (2020). Effects of *Leucosporidium*-derived ice-binding protein (LeIBP) on bull sêmen cryopreservation.

- Jones, A. L. (2021). Cryopreservation of bovine embryos. En: Hooper, R. M (ed.) *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons, Inc, Estados Unidos. 1103-1109. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch87>
- Kim, W., Yang, S. G., Park, H. J., Kim, J. H., Lee, D. M., Woo, S. M., Kim, H. J., Kim, H. A Jeong, J. H., Lee, M. J., & Koo, D. B. (2020). Comparison of Cryotop and ReproCarreir products for cryopreservation of bovine blastocysts through survival rate and blastocysts quality. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 35(2), 207-213. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.2.207>
- Knetter, C. (2023). Eficiencia de un medio de vitrificación con ficoll y trehalosa sobre la viabilidad de embriones de conejo. (Tesis de grado). Universidad Técnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y Medicina Natural, Valencia, España. <http://hdl.net/10251/195853>
- Kurzella, J., Miskel, D., Rings, F., Tholen, E., Tesfaye, D., Schellander, K., Salilew-Wondim, D., Held-Hoelker, E., Große-Brinkhaus, C., Hoelker, M., Kurzella, J., Miskel, D., Franca, R., Tholen, E., Tesfaye, D., Schellander, K., Salilew-Wondim, D., & Held-Hoelker. (2024). Mitochondrial bioenergetic profiles of warmed bovine blastocysts are typically altered after cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 214(15), January, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.002>
- Li, P., Liu, Y., Yan, L., Jia, Y., Zhao, M., Lv, D., Yao, Y., Ma, W., Yin, D., Liu, F., Gao, S., Wusiman, A., Yang, K., Zhang, L., & Liu, G. (2023). Melatonin improves the vitrification of sheep morulae by modulating transcriptome. *Theriogenology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1212047>
- Li, X., Wang, L., Yin, C., Lin, J., Wu, Y., Chen, D., Qiu, C., Jia, B., Huang, J., Jiang, X., Yang, L., & Liu, L. (2020). Antifreeze protein from *Anatolia polita* (ApAFP914) improved outcome of vitrified *in vitro* sheep embryos. *Cryobiology*, 93, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiology.2020.02.001>
- Loutradi, K. E., Kolibianakis, E. M., Venetis, C. A., Papanikolaou, E. G., Pados, G., Bontis, I., & Tarlatzis, B. C. (2008) Cryopreservation of human embryos by vitrification or slowfreezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 90(1), 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.010>
- Marcantonini, G., Bartolini, D., Zatini, L., Costa, S., Passerini, M., Rende, M., Luca, G., Basta, G., Murdolo, G., Calafiore, R., & Galli, F. (2022). Natural cryoprotective and cryoprotective agents in cryopreservation: A focus on melatonin. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103254>

- Martínez, I., Salas, A., Diaz, J., Ordóñez, E., García, T., Yeste, M., Olegario, C., & Mogas, T. (2024). Blastocoel fluid aspiration improves vitrification outcomes and produces similar sexing results of *in vitro*- produced cattle embryos compared to microblades biopsy. *Theriogenology*, 218(1), 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.01.042>
- Najafzadeh, V., Bojsen-Møller, J., Pihl, M., Aerenlund, A., Jørgensen, A., Kjærsgaard, K., Træholt, M., Friederike, M., Strøbech, L., & Hyttel, P. (2021) Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine *in vitro* produced blastocysts. *Theriogenology*, 171, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.020>
- Oliveira, C. S., da Silva, V. L., de Freitas, C., da Silva, P. M., dos Reis, A. J., & Zoccal, N. (2020). In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle. *Cryobiology*, 97, 222-225. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.02.007>
- Pegg, D. E. (2015). Principles of Cryopreservation. En: Wolkers, W.F; Oldenhof, H (eds.) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, *Methods in Molecular Biology*, 1257, 3-19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_1
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666. <https://doi.org/10.1038/164666a0>
- Rajan, R., & Matsumura, K. (2018). Development and Application of Cryoprotectants. En: Iwaya-Inoue, M; Sakurai, M; Uemura, M. (eds) Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Singapore, 1081, 339-354. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_18
- Rall, W. F. (1987). Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24, 387-402. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90042-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90042-3)
- Rall, W. F., & Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313, 573-575. <https://doi.org/10.1038/313573a0>
- Santana, R., Guibu, T., Alves, M.B., Martins, D., Basso, A. C., & Sudano, M. J. (2020). Cellular and apoptotic status monitoring according to the ability and speed to resume post-cryoconservation embryonic development. *Theriogenology*, 158, 290-296 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.026>
- Souza, J. F., Oliveira, C. M., Lienou, L. L., Cavalcante T. V., Alexandrino E., Santos R. R., Rodrigues A. P. R., Campello C. C., Figueiredo, J. R., & Dias F. E. F. (2018). Vitrification of bovine embryos followed by *in vitro* hatching and expansion. *Zygote*, 26(1), 99-103. <https://doi.org/10.1017/s0967199417000570>

- Sun, W. S., Jang, H., Kwon, H. J., Kim, K. J., Ahn, S. B., Hwang, S., Lee, S. G., Lee, J. H., & Hwang, I. S. (2020). The protective effect of *Leucosporidim*-derived ice-binding protein (LeIBP) on bovine oocytes and embryos during vitrification. *Theriogenology*, 151, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.016>
- Umair, M., Beitsma, M., de Ruijter-Villani, M., Deelen, C., Herrera, C., Stout, T. A. E., & Claes, A. (2023). Vitrifying expanded equine embryos collapsed by blastocoel aspiration is less damaging than slow-freezing. *Theriogenology*, 202, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.02.028>
- Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65, 236-234. <https://doi.org/j.theriogenology.2005.09.026>
- Vajta, G., Rienzi, L., & Ubaldi, F. M. (2015). Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(4), 325-333. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.12.012>
- Valente, R. S., Marsico, T. V., & Sudano, M. J. (2022). Basic and applied features in the cryopreservation progress of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 239. <https://doi.org/j.anireprosci.2022.106970>
- Viana, J. H. M. (2020). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 39(4).
- Vining, L. M., Zak, L. J., Harvey, S. C., & Harvey, K. E. (2021). The role of apoptosis in cryopreserved animal oocytes and embryos. *Theriogenology*, 173(1), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.017>
- Wang, Z., Gao, D., & Shu, Z. (2024). Mechanism, applications and challenges of utilizing nanomaterials in cryoconservation. *Advanced Engineering Materials*. 26(21). <https://doi.org/10.1002/adem.202400800>
- Whittingham, D. G., Leibo, S. P., & Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to --196° and -269°C. *Science*, 178, 411-414. <https://doi.org/10.1126/science.178.4059.411>
- Wu, C. W., & Cheong, S. H. (2023). Evaluation of two-stage delipidation on bovine embryo development and cryotolerance. *Reproduction, Fertility and Development*, 36(2), 170-171. <https://doi.org/10.1071/RDv36n2Ab41>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: HNQ; análisis e interpretación de los datos: HNQ; redacción del artículo: HNQ.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.