

Capítulo 8

Procedimientos para la criopreservación de células reproductivas y embriones bovinos

Autores: Natalia Andrea Gómez Morales,
Juliana Victoria Bedoya Jaramillo, Felipe Penagos Tabares,
Ángela Patricia López Cardona, Yasser Yohan Lenis Sanín
y David Andrey Cadavid Betancur

La conservación de recursos genéticos mediante congelación a bajas temperaturas es una opción para maximizar el potencial reproductivo de animales de interés. Para ello se han desarrollado diferentes técnicas con resultados variables. Una de ellas es la vitrificación, para la cual existen diferentes procedimientos de acuerdo a la experiencia de cada laboratorio. A continuación se describen los procedimientos de criopreservación utilizados en el laboratorio para conservar células reproductivas y embriones bovinos.

Vitrificación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la vitrificación de embriones bovinos.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15ml, OPS (Open Pulled Straw), go-belets, escalerilla, cinta, cajas de Petri de 100 mm, y puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l, cronómetro, termo con nitrógeno líquido.
- **Medios:** Medio de mantenimiento (MM), medio (SV1), medio (SV2), nitrógeno líquido (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y gafas para manipulación de nitrógeno (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- Seleccionar los embriones que se encuentren en estadios transferibles: mórula compacta (Mo), blastocisto temprano (Bt), blastocisto (BL) y blastocisto expandido (BX) (ver figura 8.1), todos grado 1 (ver tabla 5.4).
- En una caja de Petri de 100 mm, servir 5 gotas de 50 μ l de medio MM, SV1 y SV2 respectivamente, y microgotas de 2 μ l de SV2 (ver figura 8.2).



Figura 8.1. Estadios transferibles aptos para vitrificación

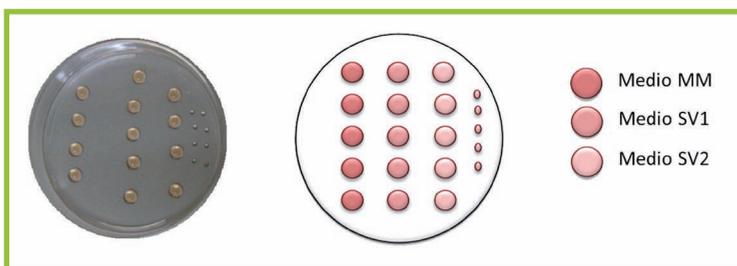


Figura 8.2. Diagrama de preparación de cajas de vitrificación.



Nota: Los medios deben estar previamente atemperados a 37°C, las gotas se deben utilizar una sola vez.

- Marcar las OPS con la cantidad y el estadio de los embriones a cargar en cada una, evitando al máximo tocar las puntas (ver figura 8.3).
- Pasar de 2 a 3 embriones seleccionados por vez al medio MM, luego pasar los embriones a medio SV1 durante 1 minuto y después, con la menor cantidad de medio SV1 posible, ponerlos en medio SV2 durante 20-25 segundos. Cargar los embriones en la OPS después de depositarlos en las microgotas (ver figura 8.4 A).
- Introducir la OPS cargada directamente y en el menor tiempo posible en nitrógeno líquido (ver figura 8.4 B).
- Almacenar la OPS en un gobelet y taparlo con la mitad de otro, disponer este en una escalerilla debidamente marcada (ver figuras 8.4 C y D).

Devitrificación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la devitrificación de embriones bovinos y su posterior cultivo.

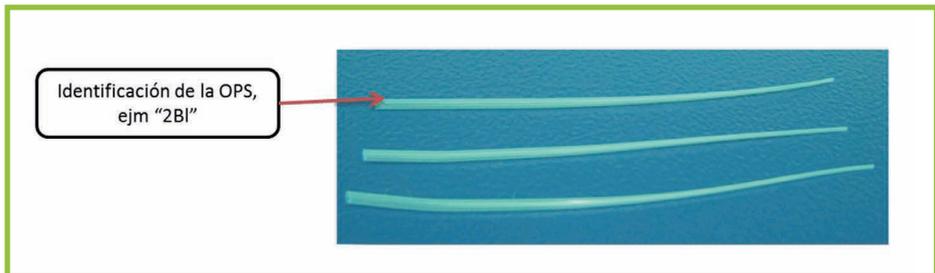


Figura 8.3. OPS (Open Pull Straw)

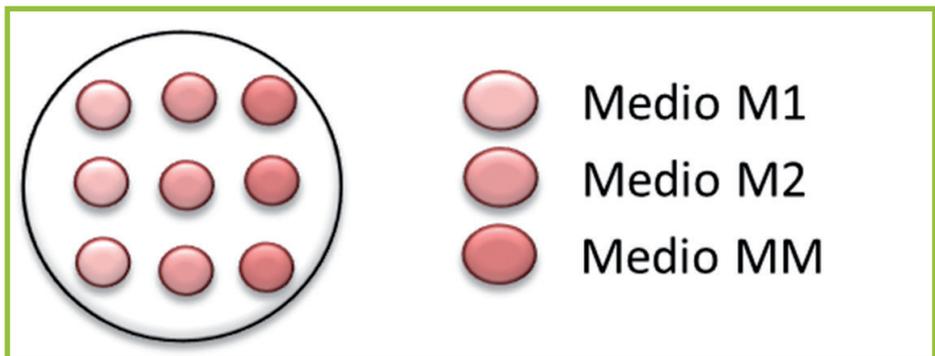


Figura 8.4 A. Empaque de embrión en OPS; B. OPS sumergida en nitrógeno; C. Empaque de OPS en escalerilla; D. Forma de almacenamiento.

- **Materiales:** Cajas de Petri de 60 mm y puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l, cronómetro y tijeras.
- **Medios:** Medios de devitrificación (M1, M2 y MM) (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y gafas para manipulación de nitrógeno (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- En una caja de Petri de 60 mm, servir 3 gotas de 50 μ l de medio M1, M2 y MM respectivamente, previamente atemperados a 37°C (ver figura 8.5).

Nota: Cada gota se debe usar una sola vez.

- Sacar las OPS del termo de nitrógeno líquido y dejarla al aire 5 segundos.
- Poner la punta de la OPS en una gota de 50 μ l de M1 para que descongele, asegurarse de que salga todo el contenido de la OPS.
- Pasar inmediatamente los embriones a otra gota de 50 μ l M1 con la menor cantidad de medio de la gota anterior y dejar los embriones allí durante 5 minutos. Poner los embriones en una gota de 50 μ l de M2 durante 5 minutos más y finalmente ponerlos en una gota de MM.
- Realizar mínimo 3 lavados con medio de cultivo CR1 AA (ver capítulo 2), y cultivar los embriones bajo las mismas condiciones que se especifican en el capítulo 5.

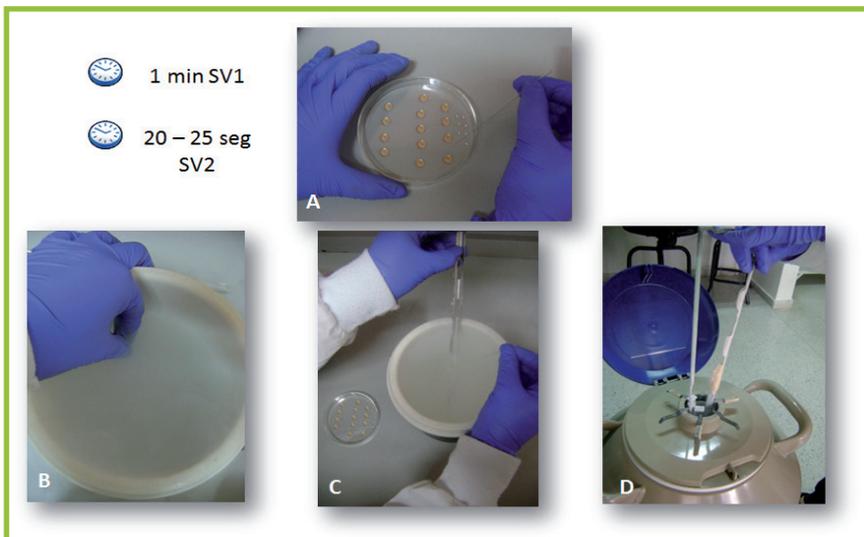


Figura 8.5. Diagrama de preparación de cajas de devitrificación.



Congelación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la congelación de embriones bovinos.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, pajillas, lacradores, cajas de Petri de 100 mm, gobelets, escalerilla, pinza metálica o isopo, puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l, emparador de pajillas o jeringa de insulina, cronómetro, congeladora, termo con nitrógeno líquido.
- **Medios:** Medio MM, medio de congelación (MC), nitrógeno líquido (ver capítulo 2),
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio y gafas para manipulación de nitrógeno (ver capítulo 1).

Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- En una caja de Petri de 100 mm, servir 10 gotas de 50 μ l de medio MM y 5 gotas del mismo volumen de medio MC.

Nota: Cada gota se debe usar una sola vez.

- Seleccionar los embriones en estadios transferibles: mórula (Mo), blastocisto temprano (Bt), blastocisto (BL) y blastocisto expandido (BX) (ver figura 8.1), grado 1 (ver tabla 5.4.) y pasarlos por las 10 gotas de MM.
- Marcar los lacradores con la cantidad y el estadio de los embriones a cargar en cada una (ver figura 8.6 B).
- Poner los embriones en el medio MC y cargar en las pajillas uno a uno o en grupo de acuerdo a la necesidad (ver figura 8.6 A y 8.6 C).
- Someter la pajilla a vapores de nitrógeno por 2 segundos (ver figura 8.7 A).
- Introducir las pajillas en la congeladora a -6°C e inducir la congelación de la pajilla con un pinza o isopo poniendo en contacto este con el nitrógeno líquido y luego

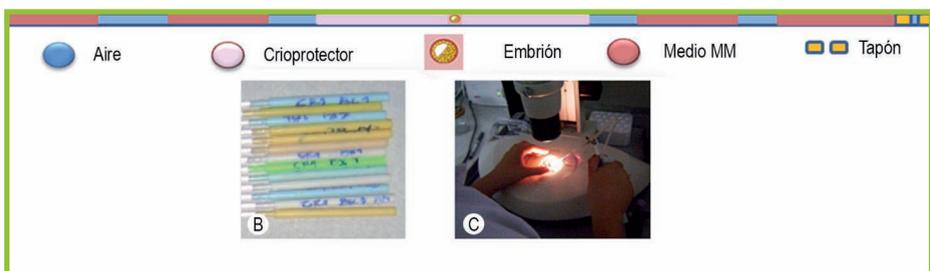


Figura 8.6 A. Diagrama de empaque de embriones; B. Lacradores marcados; C. Empaque de embriones

poniéndolo directamente sobre las columnas adyacentes a la columna que contiene el embrión con el fin de generar una cristalización homogénea (ver figuras 8.7 B y C).

- Comenzar con el descenso de temperatura a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta -35°C (ver figura 8.7 D).
- Introducir inmediatamente las pajillas directamente en el termo con nitrógeno líquido (ver figura 8.7 E).

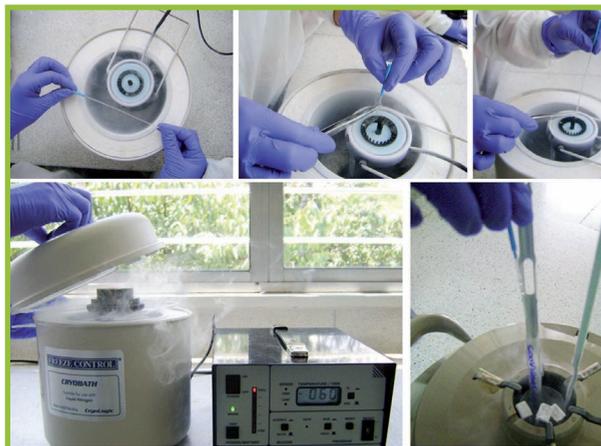


Figura 8.7 A. Vapores de nitrógeno; B. Seeding de la parte superior de la pajilla; C. Seeding de la parte inferior de la pajilla; D. Congeladora en funcionamiento; E. almacenamiento de embriones congelados.

Nota: El proceso de la selección de los embriones y la introducción en la congeladora no debe superar los 10 min.

Descongelación de embriones bovinos

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para la descongelación de embriones bovinos, ya sea para su cultivo o para transferencia directa.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos de 15 ml, cajas de Petri de 60 mm, puntas para las micropipetas.
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, micropipetas de 10, 100 y 1000 μl , cronómetro, termo de nitrógeno líquido.
- **Medios y reactivos:** Medio de mantenimiento MM (ver capítulo 2).
- **Indumentaria:** Trabajo en laboratorio (ver capítulo 1) y gafas para manipulación de nitrógeno.



Procedimiento: En cabina de flujo laminar:

- En una caja de Petri de 60 mm, servir 6 gotas de 50 μ l de medio MM y 3 gotas de 50 μ l de medio CR1 AA, previamente atemperados a 37°C (ver figura 8.8).

Nota: Cada gota se debe usar una sola vez.

- Retirar la pajilla del termo de nitrógeno y dejarla 5 segundos al aire; luego, sumergirla en agua a 32°C por 30 segundos.

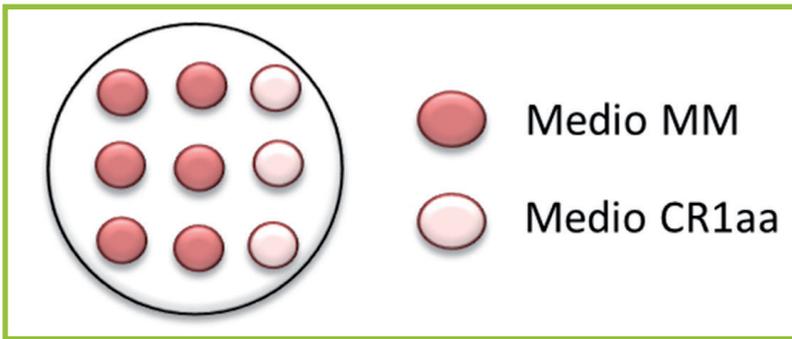


Figura 8.8. Diagrama de preparación de cajas de descongelación.

- Vaciar la pajilla en caja de Petri y poner los embriones en la primera gota de MM por 1 minuto, luego pasarlos a una segunda gota de MM por otro minuto. Finalmente, realizar mínimo 3 lavados con medio de cultivo CR1 AA (ver capítulo 2) y cultivar los embriones bajo las mismas condiciones que se especifican en el capítulo 5.

Nota: para transferencia directa se retira la pajilla del termo de nitrógeno, se deja 5 segundos al aire y se sumerge en agua a 32°C por 30 segundos; se debe transferir dentro de los primeros 15 minutos.

Lavado de CEEP precongelamiento

- **Propósito:** Describir el procedimiento de eliminación de residuos del medio de cultivo y detritos celulares antes de la criopreservación.
- **Materiales:** Puntas de 1000 μ l, tubos de microcentrífuga, crioviales de 1 ml.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipeta de 1000 μ l, centrífuga.

Procedimiento:

- Extraer de la incubadora la caja de 24 pozos que contiene las células y llevar a la cabina de flujo.

- Desprender las células adheridas al fondo de los pozos con una punta de 1000 μl estéril (acción mecánica) Realizar este procedimiento asegurándose de haber cubierto la totalidad del pozo (ver figura 8.9 A).



Figura 8.9. Lavado de CEEP precongelamiento. A. Desprendimiento de las células del pozo; B. Almacenamiento de las células en el criovial.

- Depositar la suspensión celular de los pozos en un vial de 1 ml previamente marcado con el biotipo celular, la fecha, la hora de congelación y el nombre del responsable; asegurar una concentración total de 1.200.000 células/ml.
- Centrifugar los crioviales a 2000 RPM por 2 minutos hasta conseguir la formación del pellet celular en el fondo.
- Extraer el sobrenadante (medio de cultivo) dejando únicamente el contenido celular; luego reemplazar el medio de cultivo por el medio crioprotector (ver figura 8.9 B).

Congelación de CEEP

- **Propósito:** Indicar el procedimiento adecuado para la congelación de CEEP.
- **Materiales:** Crioviales de 1 ml, nevera de poliestireno expandido, hielo, nitrógeno líquido, gasas estériles, puntas para micropipeta 1000 μl estériles.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipetas de 1000 μl , microcentrífuga, nevera de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, termo de nitrógeno líquido.
- **Medios y reactivos:** Etilenglicol probado para células, RPMI.

Procedimiento:

- Preparar una nevera de poliestireno expandido con hielo (temperatura aproximada $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) y depositar el criovial en la nevera durante 1 hora.



- Someter los crioviales a una temperatura de -20°C durante 2 horas; asegurarse de que el cambio de 0°C a -20°C se realice de forma rápida.
- Someter los crioviales a -80°C por 3 horas; asegurarse de que el cambio de -20°C a -80°C se realice de forma rápida (ver figura 8.10 A).
- Introducir los crioviales en una canastilla vacía del termo de nitrógeno líquido.
- Sellarse, introduciendo a la canastilla una gasa estéril para evitar que los tubos floten.
- Evaluar periódicamente los niveles de nitrógeno líquido para asegurar la viabilidad de las células congeladas (ver figura 8.10 B).

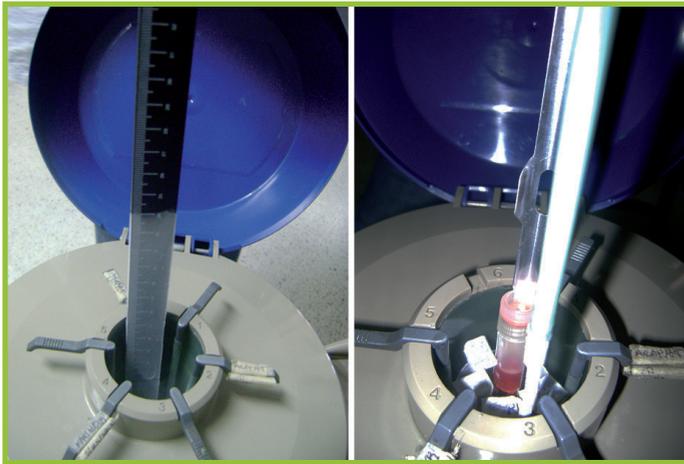


Figura 8.10. Congelación de CEEP. A. Almacenamiento del criovial en nitrógeno líquido; B. Medición del nivel de nitrógeno líquido.

Descongelación y cultivo de CEEP

- **Propósito:** Describir el procedimiento de descongelación, lavado y cultivo de CEEP.
- **Materiales:** Puntas de $1000\ \mu\text{l}$, tubos de microcentrífuga, cajas Petri.
- **Equipos:** Baño serológico, cabina de flujo laminar, micropipeta de $1000\ \mu\text{l}$, centrífuga, microscopio, cámara de Neubauer.
- **Medios:** RPMI suplementado (ver capítulo 2).

Procedimiento:

- Extraer del termo de nitrógeno líquido los crioviales que serán destinados a descongelación (ver figura 8.11 A).

- Introducir por un minuto los crioviales al baño serológico, graduado previamente a una temperatura de 30°C (ver figura 8.11 B).
- Centrifugar los crioviales a 2000 RPM por 2 minutos hasta conseguir la formación del pellet celular en el fondo.
- Extraer el medio crioprotector y remplazar con 1 ml de RPMI suplementado, teniendo en cuenta que el medio de lavado esté temperado a 30°C.
- Centrifugar de nuevo los crioviales a 2000 RPM por 2 minutos hasta conseguir la formación del pellet celular en el fondo del criovial.
- Extraer el medio de lavado y remplazarlo con 1 ml de RPMI suplementado. El medio de cultivo debe estar precalentado a 30°C.
- Homogenizar las células, realizar el conteo en cámara de Neubauer y sembrar en una caja de pozos a la concentración deseada (ver figura 8.11 C).
- Llevar la caja a la incubadora a condiciones controladas (37,5°C, 5% CO₂, 90% de humedad relativa).
- Realizar cambio de medio cada 48 horas (ver capítulo 3).
- Evaluar el cultivo periódicamente como en el cultivo inicial. (ver figura 8.12)

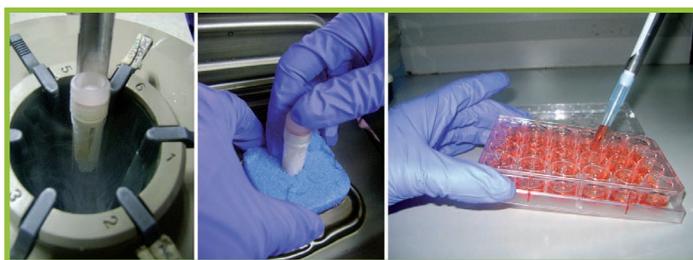


Figura 8.11. Descongelamiento de CEEP. A. Extracción del criovial del termo de nitrógeno; B. Criovial en el baño serológico; C. Cambio de medio de cultivo.

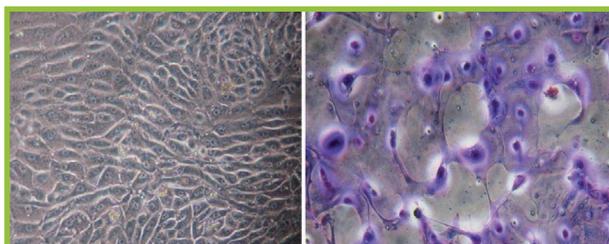


Figura 8.12. Morfología de CEEP sometidas a la criopreservación. A. Se observan CEEP de 8 días posdescongelación; estas presentan una confluencia de 90% aproximadamente; B. Se observan CEEP con 4 días posdescongelación teñidas con hematoxilina-eosina.



Bibliografía recomendada

- Freshney, R. I. (1994), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª ed., Nueva York: Wiley-Liss, pp. 254-263.
- Hay, R. J. (1978), *Preservation of Cell Culture Stocks in Liquid Nitrogen*, TCA Manual 4, pp. 787-790.
- Lenis Y., Olivera M., Duque M., Tarazona A. (2009), Criopreservación de células epiteliales endometriales bovinas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, Medellín, Vol. 62, fasc. 3: 64.
- Schroy, C. B.; Todd, P. (1976), *A Simple Method for Freezing and Thawing Cultured Cells*, TCA Manual 2, Procedure Number 76035, pp. 309-310.
- Shannon, J. E.; Macy, M. L. (1973), Freezing, Storage, and Recovery of Cell Stocks, en: P. F. Kruse y M. K. Patterson Jr (eds.), *Tissue Culture: Methods and Applications*, Nueva York: Academic Press, pp. 712-718.

Desde 1995, el grupo de investigación Biogénesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia ha estado dedicado a la investigación en biotecnología de la reproducción, y una de las principales dificultades para llevar a cabo el trabajo de laboratorio ha sido la falta de protocolos para la rutina del cultivo de tejidos reproductivos y para la producción y manipulación de los embriones, incluyendo las buenas prácticas en estos procesos. El presente libro recoge la experiencia de nuestro grupo y se presenta como un aporte para estimular la investigación y el servicio en este campo biotecnológico.



Autores y editores académicos