

CONGELACIÓN DE EMBRIONES EQUINOS: FACTORES A TENER EN CUENTA Y DESARROLLO DE LA TÉCNICA.

I. Martín, A.Monge

MONGE VETERINARIOS SLP. Centro de reproducción de grandes animales. Guadalix de La Sierra. Madrid

Introducción

La congelación de embriones equinos sigue siendo un reto para el veterinario debido a los pobres resultados obtenidos en cuanto a eficiencia reproductiva se refiere, la dificultad de la técnica y el alto coste que supone para el criador. Hasta la fecha, y a diferencia de otras especies, solamente se han logrado alrededor de 50 nacimientos en el mundo producto de embriones criopreservados. A pesar de ello, resulta un procedimiento a tener en cuenta y a desarrollar, ya que permite optimizar la productividad de los programas de cría así como abre las puertas a un mercado internacional de embriones, permite el almacenamiento durante un tiempo ilimitado de importantes líneas genéticas y reduce los costes asociados con los programas de sincronización y el mantenimiento de yeguas receptoras. El primer potro nacido proveniente de un embrión congelado mediante congelación convencional fue reportado en 1982 [1] por Yamamoto. Desde entonces, han sido muchos los investigadores y veterinarios los que han intentado conseguir una técnica rápida, sencilla, fiable y de bajo coste que permitiese obtener unos índices de preñez y de partos aceptables. Desafortunadamente, y a pesar de que algunos de ellos han conseguido tasas de preñez elevadas, en la actualidad no existe un protocolo de congelación de embriones equinos estandarizado y que permita resultados repetibles en condiciones de campo.

La congelación convencional (CC) consiste en la exposición del embrión a concentraciones crecientes de crioprotectores, deshidratando el embrión mientras se va enfriando a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -6°C , cuando se induce el "seeding", iniciándose la cristalización; a continuación se desciende la temperatura hasta -35°C y finalmente, se introduce en nitrógeno líquido a -196°C para su almacenamiento [2]. La vitrificación (VT) es un procedimiento mucho más rápido y se puede realizar bajo condiciones de campo. Este proceso requiere la exposición secuencial del embrión a 3 soluciones de concentración creciente de crioprotector, mucho mayores a las empleadas en la CC, evitando la formación de cristales durante el proceso de congelación. En 1994, y por primera vez, Hochi y col. lograron el nacimiento de un potrillo procedente de un embrión vitrificado. La descongelación se realiza según el crioprotector empleado y la concentración de éste. Por dilución seriada, exponiéndolo a concentraciones decrecientes de crioprotector para posteriormente transferirlo a una receptora o bien por transferencia directa, en este caso, es más simple, y tras descongelar la pajueta se transfiere el embrión directamente a una receptora.

Factores que influyen en la congelación de embriones equinos

Calidad, tamaño y edad del embrión

El tamaño y el estadio de desarrollo del embrión recuperado son factores claves en el éxito de la congelación de embriones equinos. La calidad del embrión recuperado es también de suma importancia, ya que sólo son aptos para la congelación los embriones de grado I (excelente) o grado II (bueno), según la clasificación de Mckinnon y Squires. Afortunadamente, la gran mayoría de los embriones recuperados son de buena calidad. Los mejores resultados se obtienen cuando congelamos mórulas o blastocistos tempranos, con un diámetro medio de 200 μm (\sim 300 μm), carentes de blastocele y sin cápsula glicoproteica que lo rodea. Estas características tienen mucha importancia en el proceso de congelación y descongelación, ya que los cambios de volumen del embrión, la cantidad de agua y la permeabilidad a los crioprotectores varía enormemente a medida que el embrión se va desarrollando. Cuando congelamos mórulas o blastocistos tempranos, el 80% de los embriones recuperados son viables tras la descongelación, obteniéndose unos índices de preñez del 50-60%, incluso pudiendo llegar al 86% (Syverson y col. 2009). Los embriones más grandes (blastocisto y blastocisto expandido) no toleran bien el proceso de congelación-descongelación, producto de un mayor índice de muerte celular y alteración de las organelas. Estos daños son debidos a la presencia de la capsula glicoproteica que rodea al embrión a partir de la etapa de blastocisto, impidiendo la adecuada difusión del CP a las células de la masa interna [3] Además, el desarrollo del blastocele, condiciona el proceso de deshidratación, aumentando las probabilidades de formación de cristales intracelulares durante la congelación que dañen las células embrionarias. Recientes trabajos de Hinrichs y col. han demostrado índices de preñez muy aceptables (86%) tras la aspiración del blastocele y posterior vitrificación [4], poniendo de manifiesto la importancia de una disminución de volumen en el proceso de criopreservación.

Toxicidad de los crioprotectores

Son varios los CPs empleados en la congelación de embriones equinos, los más comunes: dimetilsulfóxido, glicerol, etilenglicol y propilenglicol. Diferentes concentraciones, y combinaciones de ellos han sido estudiadas y comparadas por numerosos investigadores en busca de la fórmula que permita un proceso de congelación y descongelación rápido, sencillo y sobretodo, que no dañe el embrión. La finalidad de los crioprotectores en el proceso de congelación es proteger al embrión de la formación de cristales de hielo por un efecto de deshidratación celular, mientras lo sometemos a un sobreenfriamiento y posterior congelación. El daño producido por los CPs viene dado por los efectos tóxicos directos de éstos sobre las células, así como por el shock osmótico durante la exposición inicial y la posterior eliminación durante su descongelación. Los efectos tóxicos directos vienen dados tanto por la temperatura a la que se realiza el equilibrado del embrión en un medio con CP puesto que determina el coeficiente de permeabilidad del embrión al CP, así como el tiempo. Las características únicas del embrión equino condicionan también la concentración y los tiempos de equilibrado en el crioprotector, en función de la etapa de desarrollo del embrión a congelar, puesto que a partir de que se desarrolla la capsula glicoproteica la permeabilidad a los CP varía enormemente, obligando a mayores tiempos de equilibrado que pueden dañar el embrión. Parece ser que el CP más permeable en el equino es el etilenglicol (Pfaff y col. 1993), así como el menos tóxico, por ello, en los últimos años está siendo el CP que mejores resultados está dando, incluso para la

criopreservación de blastocistos expandidos. Su empleo solo o en combinación con otro CP penetrante, así como la adición de crioprotectores no penetrantes es cada vez más frecuente tanto para la CC como para VT.

Recuperación del embrión, número de ovulaciones y la yegua donante

Se estima que el embrión equino desciende al útero desde el oviducto a partir del día 5,5 +/- 10-22 horas desde la ovulación (Wilson, 1987) aunque en las yeguas, existe una gran variabilidad en cuanto al intervalo ovulaciónfertilización, índice de desarrollo embrionario e intervalo de llegada al útero. El lavado uterino en el día 6 está asociado con un índice de recuperación más bajo (Boyle y col. 1989), porque en numerosas ocasiones el embrión aún no ha llegado al útero. La ventana de tiempo que tenemos para la recuperación de embriones destinados a congelación es de 144-168 h (6-7 días), por ello, el día 6,5 post-ovulación, es el más conveniente para conseguir unos índices de recuperación aceptables ligados a la obtención de embriones en la etapa embrionaria y tamaño adecuado para la congelación. Eldridge-Panuska y col. (2005) [5] demostraron una tasa de recolección embrionaria del 78% cuando realizaron el lavado uterino 6.5 d después de la visualización ecográfica de la ovulación u 8 días después de la administración de HCG; observando que la sincronización de la recolección con la administración de HCG, resultó en la obtención de un mayor número de embriones del tamaño adecuado. Se ha observado un retardo en el descenso de los embriones al útero en el caso de yeguas viejas, cuando se insemina postovulación, cuando inseminamos con semen congelado o pronto en la estación reproductiva [6]. Además, la edad y la historia reproductiva de la yegua donante también son factores muy importantes en la recuperación del embrión, ya que con la edad, aumentan mucho las probabilidades de muerte embrionaria precoz, por patología uterina u oviductal, así como se ve comprometida la movilidad del embrión en el útero. El número de ovulaciones también es un factor a tener en cuenta, como en cualquier programa de transferencia de embriones. La media de recuperación cuando se producen ovulaciones dobles o triples es mayor que para ovulaciones simples; siendo mayor la tasa de ovulación y por consiguiente de recuperación en yeguas pura sangre inglés, razas de tiro y razas de sangre caliente.

Método de transferencia

En función de la concentración y el tipo de crioprotector empleado y la técnica de congelación, CC o VT, podremos realizar una técnica de transferencia u otra tras la descongelación del embrión. Por regla general, cuando realizamos CC, debemos realizar dilución seriada (SD) del CP, con el fin de no producir daños en el embrión como consecuencia de los efectos tóxicos del CP a altas temperaturas, así como para minimizar la respuesta inflamatoria del útero post-transferencia. Por el contrario la transferencia directa (TD), consiste en la mezcla del embrión en la solución de crioprotector con la solución de mantenimiento en la misma pajueta en la que se ha congelado, realizándose la transferencia inmediatamente después de la descongelación, sin necesidad de una manipulación extra. Esta técnica es la más utilizada en la actualidad, tanto si se realiza CC como si se somete al embrión a un proceso de VT. Es la que mejores resultados rinde (% Preñez= 62%, DT VS 46%, SD) [5], además que le permite al veterinario realizar la transferencia de manera más sencilla sin necesidad de un microscopio o medios de dilución en condiciones de campo.

La yegua donante

Las yeguas candidatas a donantes, en muchas ocasiones, son yeguas de concurso, dedicadas al deporte, yeguas viejas, con bajos índices de fertilidad o yeguas con problemas para llevar una gestación a término. En cualquier caso, la mejor candidata será una yegua joven, múltipara y de conocida historia reproductiva sin problemas de fertilidad, de esta forma el rendimiento de la técnica será mayor. La preparación de la yegua estará dirigida en sincronizar de la manera más exacta posible el momento de la ovulación con el día de la recuperación, con el fin de obtener un embrión con las características más adecuadas para la congelación. Asegurarse previamente de la buena salud reproductiva de la yegua donante mediante ecografía, citología y cultivo, son medios diagnósticos muy recomendables antes de dedicar a una yegua a un programa de transferencia embrionaria. Empezar a inseminar la yegua después de que haya tenido 1-2 celos tras el anestro parece razonable, puesto que tendremos celos más regulares y de mayor fertilidad. Monitorizar el celo ecográficamente, como mínimo dos veces al día, sincronizar la ovulación con la administración de HCG a partir de un folículo de 35 mm, son factores claves para el éxito. La inseminación con semen fresco es preferida a hacerlo con semen refrigerado o congelado.

La yegua receptora

Preferiblemente, la yegua receptora debe ser una yegua joven (3-12 años), múltipara, con una historia reproductiva favorable, libre de enfermedades infecto-contagiosas y en buena condición corporal. El mejor momento para la transferencia será cuando está sincronizada con la donante +2,+1, 0,-1,-2. Por otro lado, se han observado índices de preñez más altos para receptoras con un ciclo abierto antes de la transferencia que para receptoras usadas en el siguiente celo tras una transferencia negativa (70% vs 25%) [5].

Recolección del embrión y preparación para la congelación

Como se comentó anteriormente el lavado se debe realizar 6,5 días post-ovulación. Tras la preparación aséptica de los genitales externos de la yegua, se introduce vía transcervical una sonda Foley de 30 Fr de diámetro conectada a un sistema en Y para infundir el útero con 3-5 litros de solución de lavado para embriones p.e. *VIGRO TM COMPLETE FLUSH*. *BIONICHE*® precalentada a 30-35°C y conectado a su vez en su otro extremo a un filtro comercial de embriones. Se realiza un flushing del útero con esta solución, de litro en litro, dejando pasar el medio extraído por el filtro para embriones.

Finalmente, se masajea el útero vía transrectal con el fin de recuperar la mayor cantidad posible de medio. Al finalizar, se administra prostaglandina a la yegua y se procede a la búsqueda del embrión en el laboratorio. El primer paso, será vaciar el contenido del filtro en una placa petri y lavarlo con aproximadamente 100 ml de solución de lavado ejercido a presión con una jeringa de 60 ml, depositando el líquido de lavado en un total de 3 placas de petri graduadas, que se colocarán en una placa calefactora a 35°C. A continuación se procede a la búsqueda del embrión bajo lupa esteroscópica a 40x. Una vez localizado el/los embrión/es, se deben lavar mediante varios (5- 10) pases seriados por el medio de mantenimiento p.e. *SYNGRO TM HOLDING*. *BIONICHE*®, para finalmente mantenerlo en este medio, y el posterior trasvase al medio de congelación. Según el crioprotector, su concentración o la técnica

de congelación (CC o VT) a emplear, el proceso de congelación y descongelación será diferente.

Proceso de congelación y descongelación

La criopreservación de embriones de cualquier especie animal consiste en los siguientes pasos: exposición del embrión a uno o más crioprotectores (CP), enfriamiento a temperaturas por debajo de 0°C bajo condiciones que implican la deshidratación del embrión, la inmersión en nitrógeno líquido a -196°C que permita un almacenamiento durante un tiempo ilimitado, calentamiento a temperaturas fisiológicas y eliminación/dilución de los CP del embrión para su posterior transferencia. Cada uno de estos pasos durante el proceso, puede producir un daño irreversible sobre el embrión y su posterior supervivencia [7]. Existen en la actualidad dos métodos reconocidos para la congelación de embriones equinos: la congelación convencional y la vitrificación. Explicaremos una técnica de cada una de ellas, aunque son numerosas las que se han empleado hasta la fecha con resultados variables:

Congelación convencional

La congelación convencional, consiste básicamente en el enfriamiento lento y progresivo del embrión, utilizando bajas concentraciones de crioprotector. El primer potro nacido en el mundo proveniente de un embrión congelado mediante esta técnica fue reportado por Yamamoto en 1982. En nuestro centro, empleamos la congelación convencional puesto que hemos obtenidos resultados muy satisfactorios. En el año 2009, conseguimos el nacimiento de una potra PRE proveniente de un embrión que había estado congelado durante 4 años [8] Si bien es cierto, creemos en la necesidad de una mayor experimentación y transferencias para poder considerarlo una técnica estándar. Combinamos la CC con la transferencia directa del embrión a la receptora, empleando etilenglicol y sacarosa como crioprotectores añadidos en un único paso. En la congelación convencional los tiempos de estabilización y los índices de enfriamiento son muy importantes y quizá sea la mayor desventaja con respecto a la vitrificación ya que implica un proceso más lento y obliga el empleo de equipamiento especializado así como una mayor experiencia y control del proceso por parte del manipulador. Una vez localizado y lavado el embrión, éste se deposita en una placa de pocillos con una solución comercial de congelación (*VIGRO TM ETHYLENE GLYCOL FREEZE WITH SUCROSE PLUS. BIONICHE*®) a base de EG 1,5 M + Sacarosa 0,1 M, durante 15-25 minutos a temperatura ambiente, mientras se estabiliza el biocongelador a 0°C. Transcurrido este tiempo se carga el embrión en una pajuela francesa de 0,25 ml con un microaspirador, de la siguiente manera: 90 µl de solución de mantenimiento, 5-10 µl de aire, 50 µl de solución de congelación con el embrión, 5-10 µl de aire, 90 µl de solución de mantenimiento, y finalmente selladas con un tapón de PVC en el extremo opuesto al algodón. Se introduce la pajuela en el biocongelador a 0°C, y se mantiene 5 minutos (aprox. -4°C/min). A continuación el índice de enfriamiento de 0°C hasta -6°C, será más lento (-0,5°C/min). A esta temperatura se induce "seeding" mediante la aplicación directa sobre el extremo de algodón de la pajuela de unas pinzas metálicas previamente sobre enfriadas en nitrógeno líquido, y se mantiene otros 5 minutos. Desde -6°C hasta -35°C la temperatura deberá descender a -0,5°C/min. Una vez en este punto, sumergimos la pajuela en nitrógeno líquido a -196°C. Ya en el nitrógeno se adapta a la pajuela de 0,25 ml otra de 0,5 ml, que llevará la identificación del embrión congelado, se coloca la pajuela en un vaso de

plástico dentro de un canister y se procede al almacenamiento dentro de un tanque con nitrógeno. La descongelación, es muy sencilla mediante esta técnica, ya que se realiza transferencia directa y por tanto no serán necesarios los pases repetidos por soluciones decrecientes de crioprotector que llevan más tiempo y aumentan el riesgo de dañar el embrión. Tras sacarlo del tanque, se airea 5-10 segundos, y a continuación se sumerge en un baño maría a 27°C durante 20-30 segundos, se extrae, se seca la pajuela y se agita para mezclar los medios. Inmediatamente después se procede a la transferencia. Con técnicas similares, han sido muchos los investigadores y veterinarios quienes han logrado índices de preñez aceptables para embriones de pequeño tamaño [9], entre otros Barfield y col. (2009) llegaron a obtener un 70% de preñez para embriones con un diámetro inferior a 200µm, congelados mediante congelación lenta o convencional.

Desafortunadamente, los índices de preñez para embriones de más de 300µm, no han sido tan buenos, tras ser sometidos a este procedimiento.

Vitrificación

La vitrificación es un proceso físico de criopreservación donde una solución líquida es transformada en un sólido estable, cuando se congela a bajas temperaturas, utilizando altas concentraciones de crioprotectores. Una de las ventajas de esta técnica es que se puede realizar en poco tiempo y no necesita equipos costosos. Entre los inconvenientes contamos con las altas concentraciones de crioprotectores que se emplean, ya que son tóxicos para las células a temperatura fisiológica, por lo que la manipulación tanto en la preparación como en la descongelación requiere de mucha atención y experiencia. En este caso, se emplean diferentes soluciones de vitrificación

[VS1: Gly (1,4 M); VS2: Gly (1,4 M) + EG (3,6 M); VS3: Gly (3,4 M) + EG (4,6 M)], en las que se combinan diferentes concentraciones de crioprotectores, normalmente glicerol y etilenglicol. Describiremos un método de vitrificación desarrollado por Carnevale [10], quien obtuvo en 2006 índices de preñez del 75% cuando vitrificó pequeños embriones transferidos directamente. Tras la localización y lavado del embrión en medio de mantenimiento, éste se irá depositando en las diferentes soluciones de vitrificación (VS) [VS1: Gly (1,4 M); VS2: Gly (1,4 M) + EG (3,6 M); VS3: Gly (3,4 M) + EG (4,6 M)] dispuestas en una placa de pocillos a temperatura ambiente. Es muy importante que este proceso se desarrolle de manera secuencial y a intervalos de tiempo muy precisos, procurando realizar los trasvases del embrión en un pequeño volumen de medio. Mantenemos 5 min en VS1, trasvasamos a VS2, donde permanecerá otros 5 min, y finalmente colocamos el embrión en 30µl de VS3, donde estará algo menos de 1 min incluyendo el tiempo de carga en la pajuela, según el procedimiento descrito para la CC, de la siguiente forma: 90µl de solución de galactosa (0,5 M), 5-10 µl de aire, 30 µl de VS3 con el embrión, 5-10 µl de aire, 90 µl de solución de mantenimiento, y finalmente selladas con un tapón de PVC en el extremo opuesto al algodón. Para la congelación, se dispone la pajuela en un canister en posición vertical sometiendo al vaso contenedor a vapores de nitrógeno durante 1 min.

Transcurrido este tiempo se sumerge pajuela y vaso en nitrógeno líquido y se procede al almacenamiento en un tanque. Puesto que este protocolo también está descrito para transferencia directa la descongelación es simple: 10 seg al aire, y luego 10 seg a

20-22°C, se agita la pajuela suavemente y se identifica el embrión. Éste debe ser transferido en menos de 10 min después de la descongelación.

Transferencia del embrión y monitorización de la gestación

Al igual que para la transferencia de embriones en fresco o refrigerados, la transferencia no quirúrgica transcervical resulta en índices de preñez iguales o superiores [11], cuando lo realizan operadores con experiencia, si lo comparamos con la transferencia quirúrgica. En la actualidad, los índices de preñez para embriones frescos, mediante transferencia no quirúrgica están en torno al 75-80% (Losinno y col. 2001).

Para embriones congelados, los índices de preñez son similares, siempre y cuando partamos de un embrión de buena calidad postdescongelación. Las ventajas de esta técnica son que resulta un método no invasivo, menos costoso y más rápido, aunque requiere de ser cuidadoso en la manipulación del cérvix, ya que puede desencadenar la liberación de PG, perdiéndose la preñez. Tras la descongelación, cargamos la pajuela en un catéter de transferencia embrionaria y se enfunda el conjunto en una camisa sanitaria, tapando con papel para evitar la radiación ultravioleta. Una vez lavado y desinfectado la vulva y el periné de la receptora, se procede a la transferencia de igual forma que una inseminación con semen congelado, dirigiendo la punta del catéter por el cérvix con el dedo índice, siendo muy cuidadosos en su dilatación. Una vez atravesado el cérvix se empuja el émbolo del fiador dejando el embrión en el cuerpo del útero. El momento ideal para la transferencia es en +1, 0, -1, es decir, la receptora está en el día 5,5-7,5 postovulación. La administración de progestágenos durante la gestación temprana y/o fármacos antiprostaglandina el día de la transferencia, son estrategias a criterio del clínico, aunque no suelen ser necesarias si no hemos sido bruscos en el procedimiento y empleamos como receptoras yeguas jóvenes. A los 7 días de la transferencia se realiza una ecografía para diagnóstico de gestación y si es positivo, se reconfirma a los 30, 45 y 60 días de gestación.

Conclusión

Son muchos los factores que afectan al éxito de un programa de congelación de embriones, aunque el factor más importante es el tamaño y el estadio de desarrollo del embrión recuperado. Un mayor conocimiento en la sincronización de la donante y una mejora en los tratamientos de superovulación permitirán un mayor rendimiento de los métodos actuales.

Tanto la congelación convencional como la vitrificación, muestran índices de preñez cada vez más elevados para embriones de pequeño tamaño, aunque a día de hoy, ninguna de las técnicas rinde resultados aceptables para la congelación de embriones de mayor tamaño. Serán necesarias más investigaciones, para adaptar un protocolo de trabajo más fiable, rápido y de menor coste, que permita impulsar el procedimiento a la importancia que merece, puesto que su desarrollo supondría un gran paso para la industria de la reproducción equina.

Bibilografía

[1] Yamamoto, Y., Oguri, ., Tsutsumi, Y. & Hachinohe, Y.(1982) **J. Reprod. Fert., Suppl.** **32, 399-403**. Experiments in the freezing and storage of equine embryos.

- [2] Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsdon RP, Seidel GE Jr. (1985) **Theriogenology** **24**, **45-58**. A new procedure for the criopreservation of equine embryos
- [3] E. Legrand, J.M. Krawiecki, D. Tainturier, P. Cornière, H. Delajarraud, J. F. Bruyas (2001) **Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 3**. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos?
- [4] Y.H. Choi, I.C.Velez, F.L. Riera, J.E. Roldan, D.L. Hartman, S.B. Bliss, T.L. Blanchard, S.S. Hayden, K. Hinrichs (2011) **Theriogenology** **76**, **143-152**. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts
- [5] W.D. Eldridge-Panuska, V.Caracciolo di Brienza, G.E. Seidel Jr. , E.L. Squires, E.M. Carnevale (2005) **Theriogenology** **63**, **1308-1318**. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos
- [6] T.A.E. Stout (2006) **Equine Veterinary Journal** **38(5)** **467-478**. Equine embryo transfer: review of developing potential.
- [7] S.P. Leibo (2001) **Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 3**. Novel Methods of embryo cryopreservation
- [8] A.Monge, I. Martín (2011) **XV Congreso AEVEE-WEVA Intermediate Meeting. Comunicación libre**: Congelación de embriones equinos en EG. Reporte de un nacimiento de una potra PRE.
- [9] Hochi.S, Maruyama.K and Oguri.N (1996) **Theriogenology** **46**, **1217-1224**. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glicol and sucrose.
- [10] E.M. Carnevale. **Vet Clin Equine** **22 (2006)** **831-841**. Vitrification of equine embryos
- [11] S. Wilsher, W. R. Allen (2004) **Equine Veterinary Education** **16 (1)** **39-44**. An improved method for nonsurgical embryo transfer in the mare Juan C. Samper. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. 2nd Edition. (2009) E. M. Carnevale. Cooling and Cryopreservation of equine embryos