

Universidad Nacional Agraria

La Molina

Facultad de Zootecnia

Departamento de Producción Animal



**“EVALUACIÓN DE SOBREVIVENCIA POST DESCONGELACIÓN
DE BLASTOCISTOS BOVINOS (*in vitro*) VITRIFICADOS EN DOS
DISPOSITIVOS CERRADOS”**

Tesis para optar el grado académico de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Rosa Condori Cabezas

Lima, Perú

2017

INDICE

	Pag.
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN – ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	
2.1 Fisiología reproductiva en Bovinos	3
2.1.1 Control hormonal del ciclo estral	3
2.1.2 Onda Folicular	4
2.2 Producción de embriones	5
2.2.1 Producción de embriones <i>in vitro</i>	5
a. Obtención de COCs de folículos	6
b. Búsqueda y clasificación de COCs	7
c. Maduración <i>in vitro</i> de COCs	8
d. Fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos	9
e. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	10
f. Clasificación de embriones	12
2.2.2 Conservación de embriones	
a. Criobiología	14
b. Crioprotectores	15
c. Refrigeración de embriones	16
d. Congelación convencional de embriones	17
e. Vitricación de embriones	17
f. Dispositivo de vitricación	20
g. Viabilidad de embriones criopreservados	24
2.2.3 Factores que afectan el éxito de la tecnología de embriones	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Lugar	29
3.2 Estandarización de protocolos	29
3.3 Producción de embriones <i>in vitro</i> en bovinos	30
3.4 Dispositivos de vitricación	33
3.5 Vitricación de embriones de bovinos producidos <i>in vitro</i>	35
3.6 Evaluación de la criosobrevivencia de embriones y tasa de recuperación	36
3.7 Diseño experimental	37
3.8 Análisis estadístico	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Eficiencia del uso o tasa de recuperación de dispositivos vitri-top y vitri-tip en la vitricación de embriones.	40

4.2	Sobrevivencia embrionaria por re-expansión a 3 h post-descongelación de los blastocistos bovinos producidos <i>in vitro</i> .	43
V	CONCLUSIONES	48
VI	RECOMENDACIONES	49
VII	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	50
VIII	ANEXOS	58

INDICE DE TABLAS

	Pag.	
Tabla 1	Clasificación de la calidad de los ovocitos.	7
Tabla 2	Clasificación de la calidad de los embriones.	12
Tabla 3	Clasificación del estado de desarrollo de los embriones.	13
Tabla 4	Vitrificación de ovocitos y embriones.	18
Tabla 5	Diferencia entre el proceso de congelación lenta y vitrificación.	19
Tabla 6	Comparación de volúmenes y tasas de congelación y descongelación.	20
Tabla 7	Medios utilizados en el proceso de vitrificación y desvitrificación.	35
Tabla 8	Eficiencia en la producción de embriones <i>in vitro</i> en Bovinos con ovarios de matadero.	39
Tabla 9	Tasa de recuperación de embriones vitrificados en dispositivos vitri-top y vitri-tip	40
Tabla 10	Tasa de re-expansión <i>in vitro</i> a 3 h post descongelación de blastocistos Bovinos producidos <i>in vitro</i> .	43

INDICE DE FIGURAS	Pag.
Figura 1 Control hormonal del ciclo estral	4
Figura 2 Ondas de desarrollo folicular	5
Figura 3 Protocolos de capacitación espermática	10
Figura 4 Cambios celulares mas notorios entre vitrificación y congelación	19
Figura 5 Menor contaminación con dispositivos cerrados	22
Figura 6 Dispositivo Cryotop®	23
Figura 7 Dispositivo Cryotip®	24
Figura 8 Laboratorio de biotecnología reproductiva UNALM	29
Figura 9 Recuperación de COCs de ovario de matadero	30
Figura 10 COCs recuperados de calidad A y B	31
Figura 11 Producción <i>in vitro</i> de blastocistos	33
Figura 12 Dispositivos para vitrificación, elaborado en el laboratorio	34
Figura 13 Esquema del proceso de vitrificación	36
Figura 14 Esquema del proceso de descongelación o desvitrificación	37
Figura 15 Diseño experimental de sobrevivencia embrionaria vitrificados en dos tipos dispositivos	37
Figura 16 Cargado de dispositivos Vitri-tip y Vitri-top	41
Figura 17 Embriones blastocistos vitrificados y cultivados <i>in vitro</i> a 3 h, post descongelación	44

INDICE DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1 Cuadro de resultados de tasa recuperación de embriones vitrificados en dispositivos vitri-tip y vitri-top.	58
Anexo 2 Cuadro de resultados de la tasa de re-expansión de embriones vitrificados a 3h de cultivo <i>in vitro</i> .	60

RESUMEN

La vitrificación es una nueva técnica que tiene muchas ventajas potenciales en ovocitos y embriones de mamíferos. En el presente trabajo, el objetivo fue comparar la tasa de sobrevivencia por re-expansión a 3 horas post descongelamiento de los blastocistos, *in vitro* vitrificados en dos dispositivos elaborados en el laboratorio. En el experimento, se utilizó el procedimiento estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, UNA La Molina, para producir embriones bovinos *in vitro*, a partir de ovocitos recuperadas de ovarios de vacas sacrificadas en matadero. Los ovocitos viables fueron incubados a 38.5°C y 5% CO₂ en grupos de 10 ovocitos en microgotas de 70 µl cubiertas con aceite mineral, por 22 a 24 horas en medio de maduración, 18 horas en medio de fecundación y 7 días en medio de cultivo. Se utilizaron un total de 100 blastocistos expandidos bovinos producidos al día 7, de cultivo *in vitro*. Los blastocistos fueron vitrificados en dos dispositivos Vitri-top (n=50) y Vitri-tip (n=50), utilizando medios comerciales (Vitrogen®, Brasil) en la vitrificación, descongelación y cultivo *in vitro*. Una vez descongelados los blastocistos de ambos grupos fueron cultivados *in vitro* por 3 horas a 38.5°C, 5% CO₂ y 90% Hd y la comparación de ambos grupos se realizaron mediante la prueba estadística Chi-cuadrado y utilizando un nivel de significancia del 5%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) en las tasas de re-expansión *in vitro* postdescongelación entre ambos dispositivos durante la vitrificación, observándose 52% (24/46) con el uso de dispositivo Vitri-tip y 48% (21/44) Vitri-top. El uso de dispositivos de vitrificación cerrados en embriones bovinos, permite lograr una baja tasa de pérdidas por manejo de bajo volumen, aunque la sobrevivencia embrionaria no fue muy impactante.

Palabras claves: Bovino, blastocistos, vitrificación, dispositivos.

ABSTRACT

Vitrification is a new technique that has many potential advantages in mammalian oocytes and embryos. In the present work, the objective was to compare of post thawing survival rate by of blastocysts vitrified *in vitro* in two devices. Standardized procedure at the Laboratory of Reproductive Biotechnology, UNA La Molina was used in the experimental part, to produce *in vitro* bovine embryos from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries. The viable oocytes were incubated at 38.5 ° C and 5% CO₂ in 10 oocytes/group microdroplet (70 µl) covered with mineral oil, for 22 to 24 hours in maturation medium, 18 hours in fertilization medium and 7 days in culture medium. A total of 100 expanded blastocysts produced bovine day 7 of culture were used. Blastocysts were vitrified in Vitri-tip (n = 50) and Vitri-top (n = 50) devices, using standard media (Vitrogen®, Brazil) on vitrification, thawing and culture *in vitro*. Once thawed blastocysts from both groups were cultured *in vitro* for 3 hours at 38.5 ° C, 5% CO₂ and 90% Hd. The comparison of both groups was performed using the statistical test Chi-square, and using a significance level of 5%. No statistically significant differences (P>0.05) in the re-expansion rates *in vitro* post thawing between both devices during vitrification were observed post thawing survival rate, 52% (24/46) Vitri-tip and 48% (21/44) Vitri-top devices. Devices using vitrification closed in bovine embryos, can achieve low loss rate in low volume management, although the embryonic survival was not very impressive.

Key words: Bovine, blastocyst, vitrification, desvices.

I. INTRODUCCIÓN

La biotecnología aplicada en la reproducción animal ha logrado grandes avances en los últimos años, desarrollando métodos de reproducción asistida en diversas especies de animales, siendo, las que destacan la transferencia de embriones, producción de embriones *in vitro* y la micromanipulación de embriones, habiéndose logrado un incremento en el número de embriones por hembra de alto valor genético, a bajo costo y salvar algunas limitaciones reproductivas en algunas especies, maximizando así su capacidad gamética.

Con los avances de la biotecnología, la criopreservación de embriones es una herramienta muy importante y ha crecido de la mano de la producción y la transferencia embrionaria. Es así que desde la primera congelación exitosa de un embrión mamífero obtenido *in vitro*, realizado hace mas de 40 años por Whittingham y colaboradores en 1972, han surgido innumerables técnicas desarrolladas con el fin de preservar embriones, con los mínimos efectos nocivos sobre su reactivación enzimática intracelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento y multiplicación, etc. Para ello muchos investigadores están en busca de protocolos cada vez más simples, que permitan disminuir el estrés en los embriones sometidos a temperaturas extremadamente bajas, donde se reduce drásticamente la actividad fisiológica de las células embrionarias y obtener resultados satisfactorios.

La vitrificación es uno de los métodos más simples y modernos de criopreservación, fue descrito por primera vez por Rall y Fahy (1985) y presenta ventajas importantes respecto a la congelación lenta, como son: no hay formación de cristales de hielo, mayor rapidez en el procesamiento y menor costo. Debido a esto, la vitrificación puede reemplazar a la congelación convencional, especialmente cuando se intenta conservar embriones sensibles a la criopreservación, como son los producidos *in vitro* (Seidel *et al.*, 2012).

Las nuevas técnicas de vitrificación de alta velocidad de enfriamiento permiten reducir dramáticamente los daños por enfriamiento, el uso de soluciones menos tóxicas y en corto tiempo de exposición al crioprotector, asimismo el uso de menor volumen de vitrificación previene la heterogeneidad de la formación de cristales de hielo (Vajta *et al.*, 2000).

El trabajo de investigación tiene por objetivo principal comparar la tasa de sobrevivencia por re-expansión a 3 horas post descongelamiento de los blastocistos bovinos producidos *in vitro* vitrificados en dos dispositivos cerrados Vitri-top o Vitri-tip y como objetivo secundario determinar y comparar la tasa de recuperación de embriones vitrificados entre ambos dispositivos cerrados.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN BOVINOS

2.1.1 Control hormonal del ciclo estral

El ciclo estral es el tiempo que ocurre entre dos períodos estrales, también llamado celo o calor, y varía normalmente entre 17 a 24 días, considerándose 21 días como tiempo promedio (Rippe, 2009). Según Galina y Valencia (2011) consta de dos grandes etapas, dependiendo de las estructuras ováricas predominantes: la fase folicular (proestro y estro) inicia con la regresión del cuerpo luteo y finaliza con la ovulación, la hormona dominante es el estradiol, y la fase luteal (metaestro y diestro) donde tiene su mayor funcionalidad el cuerpo lúteo, siendo la hormona dominante la progesterona.

Las hormonas LH y FSH, sirven como mensajeros químicos y regulan las fases del ciclo estral siendo liberados de manera tónica o en oleadas (Hafez, 2002). La FSH es encargada del proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular y la LH es la que interviene en el proceso de ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (Rippe, 2009), asimismo menciona que los estrógenos tienen un efecto de retroalimentación positiva sobre el hipotálamo, produciendo la liberación de GnRH que a su vez inducirá la liberación de FSH (Hormona Folículo Estimulante) y LH (Hormona Luteinizante) en la hipófisis anterior, asimismo la progesterona producida en el cuerpo lúteo por acción de la LH, produce un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo (Figura 1).

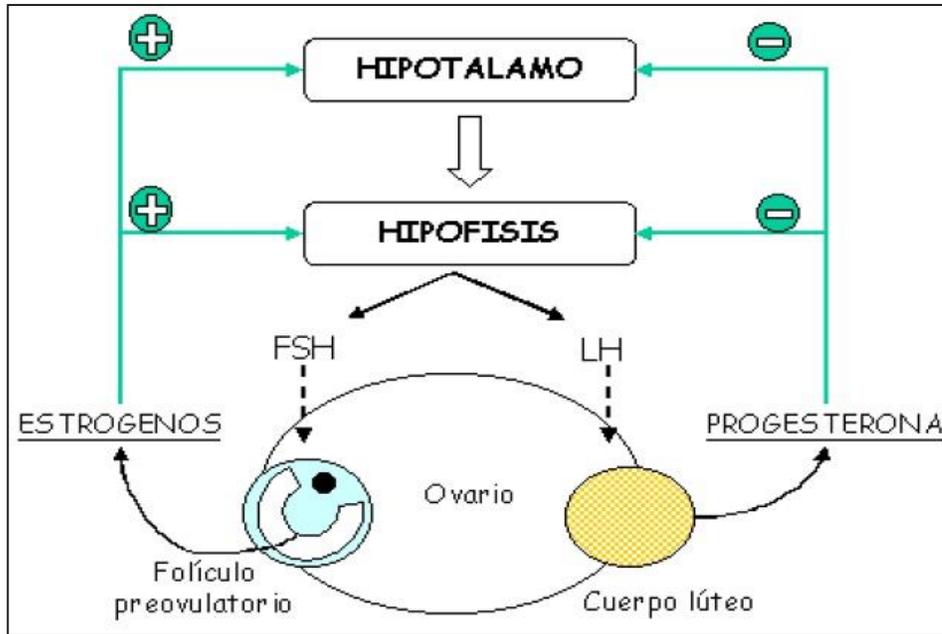


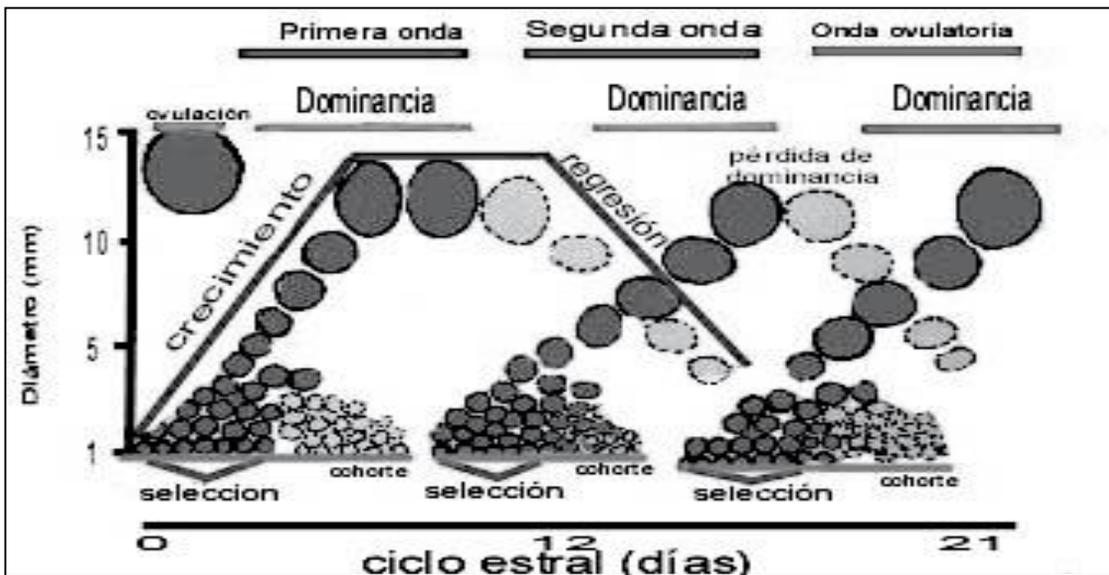
Figura 1: Control hormonal del ciclo estral (Redondo, 2002)

2.1.2 Onda folicular

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos primordiales que conllevan al desarrollo de un folículo preovulatorio (Sintex, 2005). También Jimenez (2009) menciona que el bovino se caracteriza por la presencia de 2-3 ondas foliculares. Los folículos crecen en oleadas en un ciclo de 21 días (Gasque, 2008), aunque Lamb *et al.*, (2009) indican que la duración de los ciclos estrales en vacas con 3 ondas foliculares son generalmente mas largos (20 – 24 días). La duración de cada onda es alrededor de 8-10 días, la cual depende de la presencia del cuerpo lúteo (Jimenez, 2009).

Según Lamb *et al.*, (2009) y Galina y Valencia (2011) el proceso por el cual los folículos se desarrollan en la vaca consta de tres estados que son: Reclutamiento, Selección y Dominancia, como se muestra en la Figura 2.

Figura 2: Ondas de desarrollo folicular de vaca (Jimenez, 2009)



2.2 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES

La obtención de embriones puede ser de procedencia *in vivo* o *in vitro*, en esta revisión se enfatizará más en producción *in vitro*.

2.2.1 Producción de embriones *in vitro*

La producción *in vitro* constituye, junto con el sexado, la tercera generación biotecnológica de la reproducción, los primeros trabajos de producción *in vitro* de embriones en especies de interés zootécnico se remontan a 1970 (Palma, 2001).

Con el nacimiento del primer bovino producido *in vitro* en 1982, mencionado por Herradón *et al.*, (2007), la técnica de fertilización *in vitro* comenzó a ser reconocida mundialmente; sin embargo, su estado fue una metodología aún restringida al ámbito experimental, y comercial en la década de los ochenta y noventa.

El proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico

son: maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros, cultivo de embriones hasta blastocistos (Mucci *et al.*, 2006; Herradón *et al.*, 2007).

a. Obtención del complejo óvulo cúmulus (COCs) de folículos

Los ovocitos pueden ser colectados de las hembras donantes por OPU (Ovum Pick-Up) o de ovarios de matadero (Rheingantz, 2007). Respecto a la recuperación de ovocitos de hembras vivas por punción transvaginal guiada ecográficamente (OPU) y su posterior maduración, fecundación y cultivo *in vitro* permite la producción de embriones (Hasler *et al.*, 1995). Este método es más utilizado y puede ser repetida en el mismo animal durante 5-6 meses y con una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto sobre la reproducción o el bienestar animal (Pelaez, 2011).

Cuando se obtiene COCs del matadero se pueden aplicar diferentes técnicas de recuperación, así tenemos la disección, donde se recorta la pared ovárica y se recogen los ovocitos, la cual tiene un alto rendimiento (90-100 por ciento) y la máxima integridad de las células del cúmulus, también se usa la aspiración con jeringa y aguja, donde se coloca dentro del folículo y se aspira, el rendimiento es del 50-75 por ciento teniendo menor calidad el cúmulus ya que se ha aspirado y arrancado el oocito del antro folicular y por ultimo la más rápida técnica del «slicing», donde se corta el ovario con bisturí y se obtienen muchos oocitos, pero variada diversidad (Gonzales, 2002).

Puerta, (2006) obtuvo por aspiración de 13.65 oocitos viables, de igual forma Hernandez-Fernandez *et al.*, (2009) reportan 4.58 ovocitos por aspiración y 7.03 por slicing, y también mencionan que la importancia de los métodos de recolección de ovocitos radica en maximizar el número de ovocitos de buena calidad. Asimismo Hoque *et al.*, (2011) indican que el porcentaje de ovocitos obtenidos de ovinos de buena calidad fueron: con método de disección 64.4 por ciento, aspiración 54.7 por ciento y corte o slicing fue 54.3 por ciento.

Al-Katanani *et al.*, (2002) mencionan que los ovarios de camal puede proveer una fuente barata de embriones. Pero se debe tomar en cuenta que estos ovarios contienen un gran número de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo (Pélaez, 2011). Por ello Lonergan y

Fair (2008) indican que la obtención de ovocitos de un folículo pequeño limita el potencial para el desarrollo durante la maduración *in vitro*. Por eso Park *et al.*, (2005) sugieren aspirar folículos entre 3 y 8 mm, debido a que se recupera al complejo ovulo cúmulus (COCs) ideal con más de tres estratos de células del cúmulo y citoplasma liso.

b. Búsqueda y clasificación de COCs

La búsqueda de ovocitos se debe realizar similar al de los embriones, bajo una lupa estereoscópica (30X) (Pelaez, 2011), siendo la morfología del citoplasma y las células del cúmulo, los mejores indicadores para determinar si el ovocito posee potencial para madurar y fecundar *in vitro* (Lonergan *et al.*, 2001).

Rizos *et al.*, (2008) señalan que la calidad intrínseca de los ovocitos está ligada a la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*. Así también, Lonergan *et al.*, (2001) indican que la prueba final de la calidad de un ovocito es su habilidad para estar fertilizado, y desarrollar hasta la etapa del blastocito, capaz de establecer una gestación y finalmente producir a un ternero vivo. A continuación se muestra la Tabla 1, donde se realiza la clasificación de los ovocitos según su morfología.

Tabla 1: Clasificación de la calidad de los ovocitos (Blondín y Sirad, 1995).

Tipo A	Ovocito inmaduro rodeado completamente de células del cúmulo, citoplasma homogéneo.
Tipo B	Ovocito inmaduro rodeado parcialmente de células del cúmulo, con citoplasma homogéneo.
Tipo C	Ovocito inmaduro con pocas células del cúmulo, con citoplasma homogéneo.
Tipo D	Ovocito maduro, sin células del cúmulo y con el citoplasma homogéneo.

Para Martínez, (2013) la calidad del ovocito es determinante en el porcentaje de fertilización obteniendo con ovocitos de calidad A, 59,4 por ciento y calidad B, 44 por ciento de fertilización, mientras que en los ovocitos de calidad C, 21,7 por ciento y D 9,5 por ciento.

c. Maduración *in vitro* de COCs

La maduración se puede dividir en dos eventos separados, la maduración nuclear y la citoplasmática, aunque ambos eventos ocurren simultáneamente y en forma interconectada. La maduración nuclear implica transformaciones cromosómicas importantes, la desintegración de la envoltura nuclear marca el inicio de la maduración, la cual progresa hasta la formación de la primera metafase (MI), seguida por la extrusión del primer cuerpo polar y la formación de la segunda metafase (MII), y con el cual se mantiene hasta la fecundación (Eppig *et al.*, 2001).

El proceso de maduración citoplasmática involucra tanto cambios morfológicos y funcionales relacionados a: 1. relocalización de organelos; 2. cambios en la expresión de proteínas celulares responsables de conducir al ovocito hacia competencias fundamentales para su desarrollo y 3. modificaciones transcripcionales del mRNA (De los Reyes *et al.*, 2007). Asimismo (Eppig *et al.*, 2001) mencionan que en la mayoría de las hembras mamíferas la maduración nuclear y citoplasmática ocurre bajo el ambiente folicular antes de la ovulación.

Los ovocitos colectados son madurados *in vitro* durante aproximadamente 24 horas, y el cultivo es realizado en estufas especiales, con una atmósfera controlada a 5% de CO₂, temperatura de 38.5°C y Hd (Rheingantz, 2007). No obstante, De los Reyes *et al.*, (1999) mencionan que la maduración *in vitro* implica no solo el reinicio de la meiosis, sino que el ovocito adquiera competencia para ser fecundado y para desarrollarse adecuadamente hasta la etapa de blastocisto.

Aproximadamente el 90 por ciento de los ovocitos inmaduros, madurados *in vitro*, alcanzan la etapa de metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 a 24 h de iniciada la maduración (Farin *et al.*, 2001; Pelaez, 2011). Asimismo, Pelaez, (2011) menciona que el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra entre el 30 y 40 por ciento. La calidad del ovocito utilizado para la producción de embriones

in vitro puede ser el factor más significativo, que afecta el desarrollo embrionario cuando otras condiciones son iguales (Lonergan, 2008).

De los Reyes *et al.*, (1999) también sostienen que la competencia para el desarrollo es menor en ovocitos madurados *in vitro* que *in vivo*, esto puede deberse a la menor competencia para el desarrollo de ovocitos colectados de folículos pequeños (2 a 6 mm de diámetro) o al desconocimiento de las condiciones de maduración y fecundación *in vitro* apropiadas para el desarrollo del embrión.

d. Fecundación *in vitro* de ovocitos

En los sistemas de fecundación *in vitro* es de vital importancia tener protocolos y metodologías adecuados para la preparación de los espermatozoides, durante este proceso de capacitación, el gameto sufre una serie de fenómenos que lo conducen a la hiperactivación y reacción acrosómica, procesos considerados vitales para la penetración espermática a la zona pelúcida y para la posterior fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito (De los Reyes 1994). Para ello se han utilizado variadas metodologías y protocolos de tratamiento espermático como «swim up» y «swim down».

La separación celular previa mediante «swim up», hace que se recuperen los espermatozoides con mejor motilidad y la posterior incubación de éstos con heparina, y la otra alternativa de separación espermática es el gradiente de percoll que es equivalente a un «swim down», ya que se recuperan del fondo del tubo los espermatozoides más motiles (ver Figura 3). Aunque cada vez se utiliza más el gradiente de densidad de Percoll, por el alto porcentaje de espermatozoides mótiles, con morfología normal y viables que se recuperan (Martinez, 2013).

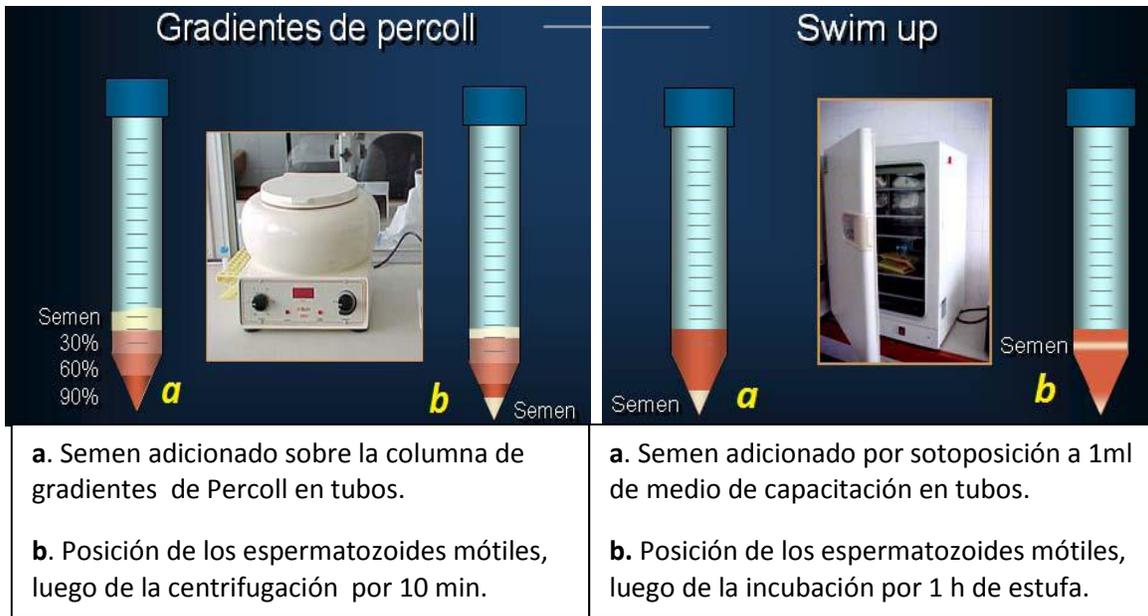


Figura 3: Protocolos de capacitación espermática (Peláez, 2011)

Los ovocitos maduros son inseminados *in vitro* con semen previamente preparado, permaneciendo los gametos juntos por un espacio de aproximadamente 18 horas (Rheingantz, 2007). Durante este proceso aproximadamente el 80 por ciento de ovocitos es fertilizado y comienza a dividirse, al menos hasta la etapa de 2 a 4 células, aunque sólo el 30–40 por ciento se desarrollará hasta la etapa del blastocisto (Farin *et al.*, 2001; Lonergan *et al.*, 2001; Mucci, 2006; Pelaez, 2011).

e. Cultivo *in vitro* de embriones

Los embriones de 2 a 4 o más células resultantes de la fecundación *in vitro*, son trasladados a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar a mórulas y blastocistos (Pelaez, 2011).

Nedambale *et al.*, (2004) mencionan que la forma de medir la eficacia de un sistema de cultivo del embrión *in vitro* es el porcentaje de formación del blastocisto y los que se desarrollan más rápido son generalmente considerados más viables y con mayor capacidad de sobrevivir después de la criopreservación, de los que desarrollan más lentamente. Asimismo, Pelaez, (2011) menciona que los parámetros biofísicos y los elementos

inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes:

- **Osmolaridad:** Lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/Kg similar a las secreciones uterinas, sin embargo, alrededor de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario.
- **Ph:** La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* se desarrollan en un pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.
- **CO₂ y O₂.** La fase gaseosa más utilizada está compuesta por 5%CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, 90% N₂ y 5% O₂ para el desarrollo embrionario.
- **El agua.** Es el componente con mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está bastante relacionado con el desarrollo embrionario.

Según Mucci, (2006) los elementos orgánicos componentes de los medios utilizados corrientemente en la producción *in vitro* de embriones son los siguientes:

- **Fuente de energía.** Se ha demostrado que durante los primeros estadíos, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadíos más avanzados de desarrollo.
- **Fuente de proteína.** Tenemos a los aminoácidos y las macromoléculas, los primeros son elementos importantes que participan en la regulación del desarrollo embrionario, los no esenciales favorecen el desarrollo en estadios tempranos, mientras que los esenciales favorecen en embriones de más de ocho células.

La adición de macromoléculas reduce la tensión superficial para favorecer la sedimentación de los embriones y evitar que estos se adhieran a algún elemento durante la manipulación, además incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen el desarrollo embrionario y absorbe e inhibe metales pesados tóxicos presentes en el medio, (Palma *et al.*, 2001).

Mucci (2006) menciona que el suero fetal bovino (SFB) tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando el desarrollo de mórulas y blastocistos. Por otra parte, Farin *et al.*, (2001) demostraron que la incorporación de suero al medio de cultivo es uno de los principales factores responsables de la presentación del síndrome de exceso de volumen fetal y de la baja resistencia a la criopreservación. Por esta razón se ha buscado substituir por macromoléculas sintéticas, igual que obtener un medio que asemeje a las condiciones naturales dentro del oviducto materno (Herradón *et al.*, 2007).

f. Clasificación de embriones

Los embriones son evaluados por varios criterios, habiéndose adoptado el de International Embryo Transfer Society (IETS), que fue desarrollado por Linder y Wrigth (1983). Se describe en la Tabla 2, donde se detalla las características para clasificar los embriones:

Tabla 2: Clasificación de la calidad de los embriones

CALIDAD	CARACTERÍSTICAS
1 Excelente	Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Al menos el 85% del material celular debería ser una masa embrionaria intacta y viable. La zona pelúcida deberá presentar superficies lisas.
2 Bueno	Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
3 Regular	Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
4 Malo	Embrión, ovocito de 1 célula, degenerado, no viable.

Palma y Brem (1993) corrobora que los embriones clasificados como excelentes o buenos tiene una alta probabilidad de alcanzar la preñez 60-70 por ciento, mientras los de muy baja calidad y transferidos con dificultad no concluyen en preñeces y nacimientos normales.

Nedambale *et al.*, (2004) también reportaron sobrevivencia postdesvitrificación con calidad excelente un 92 por ciento, bueno 8 por ciento, con blastocistos bovinos de 7 días. Aunque la morfología no ofrece pronosticabilidad de tasas de preñez, la calidad embrionaria es conocida como un factor significativo en la tasa de gestación (Hasler, 2004).

Respecto a la clasificación de embriones obtenidos mediante el cultivo *in vitro*, Palma (2001) y Galina (2011) mencionan que el estado de desarrollo del embrión se identifica de acuerdo con el desarrollo morfológico, por ello los primeros estadios se denominan según el número de células: 2 células, 4 células, 8 células, hasta 16 células y luego reciben diferentes nombres como mórula, blastocisto según su estado de desarrollo. Adicional a estas denominaciones Bó y Mapletoft (2013) señalan códigos de clasificación estándar basados en el Manual IETS, catalogando a un ovocito no fertilizado (codigo1), embrión de 2 a 12 células (código 2), los siguientes estadios se describen a continuación (Tabla 3):

Tabla 3: Clasificación del estado de desarrollo de los embriones

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS
Codigo 3 Mórula	Dificultad para discernir uno de los blastómeros, la masa celular (embrión) ocupa la mayor parte del espacio perivitelino (edad estimada 5 días).
Codigo 4 Mórula compacta	En la cual sus blastómeros están unidos y constituyen una sola masa compacta que ocupa entre el 60-70% del espacio perivitelino.
Codigo 5 Blastocisto temprano	Estadio en el cual se forma una cavidad (blastocele) en el interior del embrión. El MCI (masa celular interna) ocupa un 70-80% del espacio perivitelino (edad estimada 7 días).
Codigo 6 Blastocisto	Existe una marcada diferenciación entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno, el blastocele ocupa el 50% del espacio perivitelino (edad estimada 7 -8 días).
Codigo 7 Blastocisto expandido	El diámetro aumenta considerablemente con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor, origina la presión creciente del blastocisto en crecimiento (edad estimada 7-8 días).
Codigo 8 Blastocisto eclosionado	Los embriones están en proceso o han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica con un blastocele bien definido o colapsado.

2.2.2 Conservación de embriones

a. Criobiología

La criobiología se encarga de estudiar los efectos de las bajas temperaturas en células y tejidos, cuya finalidad es la criopreservación entre -80 y -196°C, manteniendo su metabolismo totalmente inactivado y detenidas todas las reacciones bioquímicas, permitiendo preservar durante el tiempo su potencial de viabilidad y su funcionabilidad celular (Avila-Portillo *et al.*, 2006).

Rodríguez y Bó, (2011) citaron que desde la primera criopreservación realizada con éxito en embriones de ratón por Whittingham en 1972, innumerables protocolos se fueron desarrollando en las diferentes especies domésticas, no solo para almacenar embriones a bajas temperaturas (-196°C), sino también con la idea de poder transportar y transferir dichos embriones de forma comercial e inocua. Finalmente hacer posible el uso rutinario de estas técnicas, aumentando la viabilidad embrionaria (Diez *et al.*, 2010).

Para lograr conservar la célula se intenta mantener su integridad a través de la remoción del máximo volumen posible de agua antes de su congelamiento, con lo cual se evita la formación de hielo, detener casi por completo la actividad fisiológica de la célula, y con el propósito de minimizar el daño y ayudar a regenerar las células (Celestinos y Gatica, 2002; Vajta y Kuwayama, 2006).

Las técnicas eficientes de criopreservación permiten la transferencia atrasada de embriones y usar ovulación múltiple y esquemas embrionarios de transferencia (MOET) aumentando la ganancia genética por selección, además se desarrollaron dos metodologías principales: congelación convencional y la vitrificación (Huang *et al.* 2006).

b. Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias de alta solubilidad y toxicidad a altas concentraciones, por lo que deben tener bajo peso molecular para entrar fácil y rápidamente a la célula y obtener el máximo efecto protector. Además un buen crioprotector debe inhibir la acción enzimática, disminuyendo la actividad de radicales libres responsables de lisis celular, antes, durante y después de la congelación y descongelación (Palma, 2001).

Los crioprotectores sustituyen parte del agua intracelular, y permiten una deshidratación celular, limitando la formación de cristales de hielo, además bajan la temperatura de solidificación de agua intracelular, sin embargo a mayores concentraciones, son embriotóxicos (Guignot, 2005) y generan estrés osmótico sobre las células, aumentando la osmolaridad del medio (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Por otro lado (Rall y Fahy, 1985) mencionan que la temperatura de exposición influencia la permeabilidad y toxicidad de estos crioprotectores, por ello una estrategia a reducir toxicidad es aminorar la temperatura.

- **Crioprotectores permeables:** Son pequeñas moléculas capaces de atravesar la membrana plasmática de las células de forma activa o pasiva, son el componente esencial en la solución vitrificante, como propilenglicol, etilenglicol (EG), glicerol (G) y dimetilsulfóxido (DMSO) (Kasai y Mukaida 2004).

Por muchos años se buscó disminuir la toxicidad de crioprotectores aplicando lo menos tóxico, aminorando concentración de productos químicos y usando dos o más crioprotectores (Kasai, 1996; Huang *et al.* 2006). Siendo la permeabilidad de la combinación de crioprotectores, mayor que la de sus componentes de forma individual, como EG y DMSO (Vajta y Nagy, 2006), estos crioprotectores tienen la propiedad de difusión rápida fuera de la célula (Kasai, 1996).

Kasai, (1996) reporta en sus investigaciones anteriores tasas de supervivencia *in vitro* en ratones con diferentes crioprotectores, obteniendo que el EG es menos tóxico 98 por ciento, con G 88 por ciento y DMSO 68 por ciento, propilenglicol 16 por ciento y el más

tóxico acetamida 0 por ciento. Por ello Hasler, (2004) menciona que el EG es ahora el crioprotector predominante y más comercial usado en embriones por los programas de transferencia.

- **Crioprotectores no permeables:** Pequeños sacáridos que son suplementarios en la solución vitrificante y se utilizan para incrementar la osmolaridad de la solución, facilitando de esta forma la salida de agua del interior de la célula, entre estos se encuentran azúcares como sucrosa, galactosa, glucosa, trehalosa entre otros, también macromoléculas como Ficoll, alcohol-polivinílico (PVA), polivinil-pirrolidona (PVP) (Kasai y Mukaida, 2004).

La sacarosa ejerce un efecto osmótico considerable, en una solución de vitrificación, reduce la toxicidad, además promueve la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (Kasai *et al.*, 1996) (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Igualmente las macromoléculas ayudan en la reducción de la toxicidad de los crioprotectores y disminuyen los niveles de crioprotector dentro de las células (Kasai y Mukaida, 2004).

c. Refrigeración de embriones

La refrigeración es un método simple por medio del cual se pueden mantener embriones a temperaturas entre 0 y 4 °C durante 24 a 72 horas (Palma, 2001; Celestinos y Gatica., 2002). Es un paso intermedio entre la transferencia de embriones en fresco y conservados a –196°C (Palma, 2001). La técnica consiste en colocar los embriones en PBS (Buffer fosfato salino), en pajuelas 0,25 ml y colocadas en un refrigerador (Palma y Brem, 1993).

Este método de conservación se utiliza para transportar embriones cuando las receptoras se encuentran distantes de las donantes, pero a pesar de los buenos resultados y de su sencillez, en la actualidad se ha reducido su uso, debido a que la criopreservación se ha convertido en una técnica que si bien es más costosa, permite mantener la viabilidad por tiempos ilimitados (Palma, 2001).

d. Congelación convencional de embriones o de curva enta (CL)

La congelación por curva lenta, es una técnica de criopreservación en la que existe un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento (0.2-0.3°C/minuto), la velocidad de deshidratación del embrión y la velocidad de formación de núcleos de hielo. Así a medida que desciende la temperatura, se produce la penetración del crioprotector al interior de la célula, produciendo un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (Albarracín, 2005; Vajta y Kuwayama, 2006).

La congelación convencional requiere de una baja concentración relativamente no tóxica de crioprotectores (1-2 M), siempre esta asociada a la lesión de la célula debido a la formación de hielo, concentración de solutos durante la congelación y la exposición prolongada al crioprotector y temperaturas entre 10 y -40°C (He *et al.*, 2008). Por ello según Dinnyes y Nedambale, (2009) y Diez *et al.*, (2010) al ser aplicados en los embriones producidos *in vitro* reducen su supervivencia en comparación con los embriones obtenidos *in vivo*, debido a formación de cristales de hielo que dañan la estructura celular.

Cuando los embriones son congelados convencionalmente, las tasas de preñez oscilan entre 50 y 60 por ciento resultando levemente inferiores a las obtenidas con embriones frescos, (Cutini *et al.*, 2000). Asimismo Belascoain *et al.*, (2010) reportan porcentajes de preñez entre 45-60 por ciento al utilizar embriones de calidad excelente y buena, este mismo autor publica una investigación realizada por Arreseigor *et al.* (1998) quienes obtuvieron porcentajes de preñez de 57,1 por ciento con embriones de calidad excelente, 52,9 por ciento con calidad buena y 31,2 por ciento con embriones de calidad regular.

e. Vitrificación de embriones

En 1985, por los reportes realizados por Rall y Fahy, (1985) la vitrificación tomó forma para la criopreservación de células y órganos, y desde allí se han realizado diversas investigaciones con la finalidad de estandarizar esta técnica en diferentes especies de mamíferos, como se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4: Vitricación de ovocitos y embriones (Escalona y Kowalski, 2008)

Mamífero	Ovocito/embrión	Año	Autor
Ratón	Embrión	1985	Rall y Fahy
Rata	Embrión	1988	Kono <i>et al.</i>
Bovino	Ovocito	1996	Martino <i>et al.</i>
Bovino	Embrión	1997	Vajta <i>et al.</i>
Oveja	Embrión	1997	Naitana <i>et al.</i>
Humano	Ovocito	1999	Kuleshova <i>et al.</i>
Cerdo	Embrión	2000	Dobrinsky <i>et al.</i>
Equino	Embrión	2001	Oberstein <i>et al.</i>
Cabra	Embrión	2001	El-Gayar y Holtz.
Llama	Embrión	2002	Aller <i>et al.</i>
Conejo	Embrión	2003	Silvestre <i>et al.</i>

La vitricación se define como la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo, ya que atraviesa el rango de temperatura crítica (+15° a – 5°C) a una velocidad de enfriamiento rápido y un pasaje rápido de líquido a estado sólido por la elevación extrema de viscosidad debido a la alta concentración de crioprotectores (Massip, 2003; Vajta y Kuwayama, 2006 y Desai *et al.*, 2013), previniendo así una de las causas de daño celular, como es la formación de hielo intracelular (Kasai y Mukaida, 2004).

La vitricación permite mejorar la supervivencia del embrión tras la descongelación (Vajta *et al.*, 2000). Asimismo permite minimizar la lesión y shock osmótico para los embriones (Mukaida y Oka, 2012), de esta forma al producir menor estrés metabólico en los embriones, da lugar a mayores porcentajes de gestación tras su transferencia a receptoras (Rall y Fahy, 1985).

La vitricación se diferencia de la congelación lenta principalmente en la existencia o no de formación de hielo en la solución durante el proceso de enfriamiento (Vajta, 2000). Los cambios celulares más notorios en los dos métodos están ilustrados en la Figura 4. Asimismo, la vitricación requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 2 500 °C/min) y elevadas concentraciones de crioprotectores de 5 a 7 M; (Vajta, 2000; Kuwayama y Vajta, 2006), además no requiere de equipos costosos de congelación (Escalona y Kowalski, 2008) como se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Diferencias entre congelación lenta y vitrificación
(Modificado de Kasai y Mukaida, 2004).

Diferencia	Congelacion Lenta	Vitrificación
Tasa de enfriamiento	0.2 a 0.3 °C/min	> 2 500°C/min
Concentración de crioprotectores	1 a 2 M	5 a 7 M
Daños por enfriamiento	++++	+
Shock Osmótica	+	+++
Toxicidad	++++	++++
Costos	++++	+

Leyenda: (+ Mínimo, +++ Mediano, ++++ Mayor)

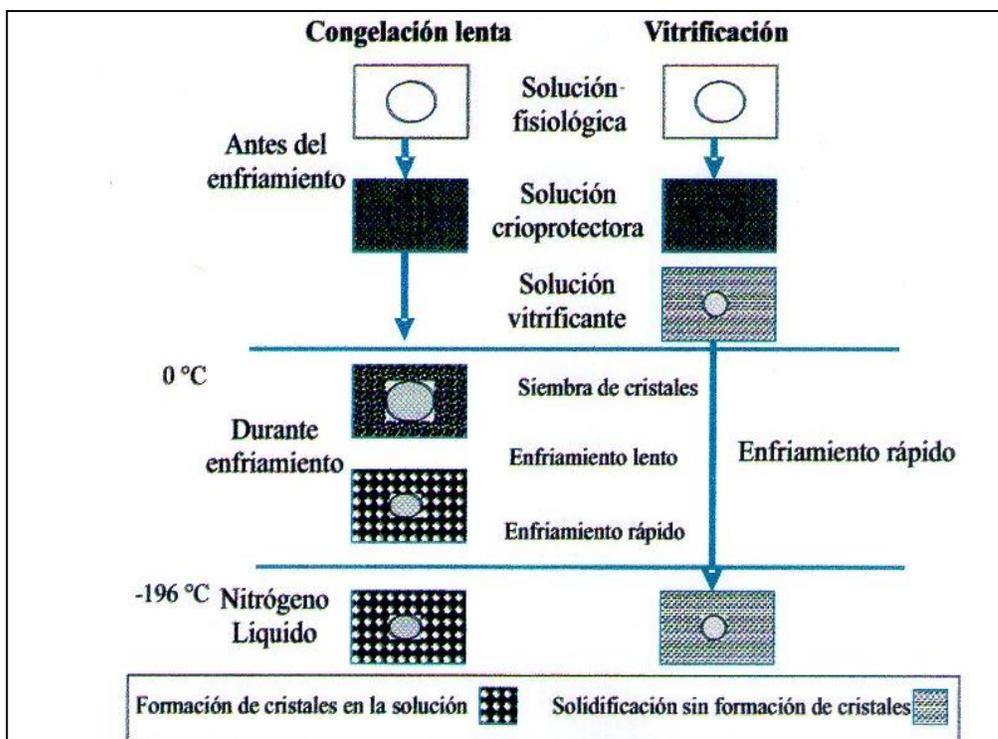


Figura 4. Cambios celulares más notorios entre vitrificación y congelación
(Modificado de Kasai y Mukaida, 2004).

f. Dispositivos de vitrificación

A finales de los años '90 el uso de vitrificación estaba limitada al uso de pajillas de 0.25ml y al tomar en contacto directo con el nitrógeno líquido lograba tasa de enfriamiento de 2500°C / min (Palasz y Mapletoft, 1996). Sin embargo, este volumen podría no distribuir uniformemente la temperatura, por lo que algunos investigadores tales como Landa y Tepla (1990) y Papis *et al.*, (1999) utilizaron microgotas (5 a 6 µl) de bajo volumen con embrión que entraba en contacto directo con el nitrógeno líquido (N₂L), dando lugar a tasa de enfriamiento muy grandes (11000 a 24000 °C / min) y altas pérdidas por flotación. Siendo necesario desarrollar dispositivos portadores de embriones en bajo volumen < 1µl (Vajta *et al.*, 2000).

Como se mencionó, el proceso de vitrificación requiere el uso de concentraciones altas de crioprotectores, y consecuentemente el riesgo de daño tóxico y osmótico incrementa, con ello crece la necesidad para usar dispositivos especiales que permitan altas tasas de enfriamiento y mínimo volumen de soluciones conteniendo los embriones (Kuwayama *et al.*, 2005). Igualmente Rodriguez y Bó, (2011) mencionaron que los grandes volúmenes de crioprotectores son limitantes de las tasas de enfriamiento como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de volúmenes y tasas de congelación y descongelación

Metodo de vitrificación	Volumen de solución µl	Tasa de congelación descongelación(°C/min)
Pajilla francesa 0.25 cc	25.0	4460 – 1300
OPS (Open-pulled straw)	1.5	16,340 - 13,900
Mínimo volum. congelación	<0.1	22,800- 42,100

Fuente: Modificado de Kuwayama *et al.*, (2005)

Anteriormente se utilizaron las pajillas de 0.25cc las cuales relativamente contenían grandes volúmenes (> 20 µL) y solo alcanzaban tasas de enfriamiento de 2.500°C/min (Palasz y Mapletof, 1996). Posteriormente, con el desarrollo de dispositivo de menor volumen (< 5

μL), asociados con el contacto directo con el nitrógeno líquido, se logró aumentar las tasas de enfriamiento hasta casi los $30.000^\circ\text{C}/\text{min}$ (He *et al.*, 2008).

Papis *et al.*, (1999) reiteran que para vitrificar se requiere dispositivos que contengan el mínimo volumen de solución vitrificante, que permitan mayor velocidad de enfriamiento. Asimismo, Kuwayama *et al.*, (2005) mencionan que las velocidades de enfriamiento varían con el tipo de dispositivo y su volumen. Criado, (2012) también señala que con dispositivos abiertos se logran altas velocidades de enfriamiento (20.000 a $30.000^\circ\text{C}/\text{min}$).

Kuwayama y Vajta (2006), AbdelHafez *et al.*, (2011) y Desai *et al.*, (2013) mencionaron que existen muchos dispositivos comerciales de vitrificación, sin embargo la eficiencia y el costo de cada uno de ellos es variable; como el Cryoolop®, VitSet (Minitub, Germano), CryoTip® (Irvin Scientific, USA), Cryotop®, HSV Straw (Cryo BioSystem, France), VitriSafe® (VitriMed, Austria), Cryopette® (Origio, Denmark) y el Rapid-i™ (Vitrolife, Sweden AB). Rodriguez *et al.*, (2010) también describen sobre *open-pulled straws* (OPS), mallas de nylon, pipetas flexibles, *flexipet denuding pipette* (FDP). Las tasas de enfriamiento que pueden lograrse con estos dispositivos son generalmente inferiores a $50.000^\circ\text{C}/\text{min}$, por lo tanto se requiere de altas concentraciones tóxicas de crioprotectores (He *et al.*, 2008).

Los embriones humanos han sido criopreservados con una variedad de dispositivos diferentes de vitrificación que son clasificados como “abierto”, los que permiten contacto directo de los embriones con nitrógeno líquido, este contacto no es recomendable, debido al riesgo potencial de la contaminación por la exposición inadvertida con contaminantes presentes en el tanque criogénico, lo contrario con el uso de transportadores de sistema “cerrado” de vitrificación se evita estos riesgos (Desai *et al.*, 2013),

Algunos métodos convencionales de vitrificación como la pajilla abierta (OPS), aplicado por Vajta *et al.*, (1997) y el Microdrops aplicado por Dinnyes *et al.*, (2000) son considerados dispositivos “abiertos” y requieren de un contacto directo de la solución embrionaria y el nitrógeno líquido, siendo este proceso un riesgo potencial de transmisión de enfermedad a través de nitrógeno líquido contaminado (Bielanski *et al.*, 2000), por lo cual este proceso no

puede estar descuidado (Kuwayama y Vajta, 2006). Para ello Kuwayama (2005) recomienda el uso del sistema “cerrado” como cryotip eliminando el potencial para la contaminación embrionaria durante la criopreservación y el almacenamiento sin comprometer la supervivencia y la tasa para el desarrollo *in vitro* e *in vivo* (ver Figura 5).

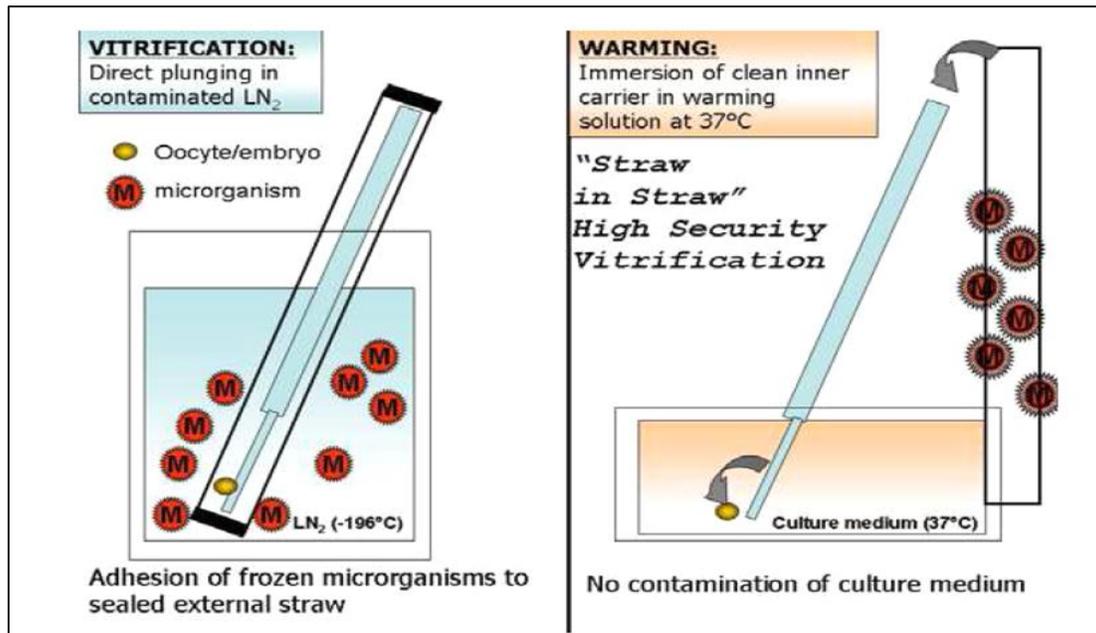


Figura 5. Menor contaminación con dispositivo cerrado (Parmegiani *et al.*, 2011)

- **Dispositivo Cryotop®.** El dispositivo cryotop® consta de una delgada tira plástica donde se coloca los embriones u ovocitos y va adjunta a una agarradera plástica, todo es cubierto por una pajilla protectora dura, que aísla los embriones del LN₂. El cargado del embrión es realizado con el uso de una pipeta capilar bajo el control de un microscopio estereoscópico y los embriones son colocados en < 0.1 µL de solución de vitrificación (Kuwayama y Vajta, 2006; Kuwayama *et al.*, 2005).

El contacto directo de solución minimizada (<0.1 µ L) de vitrificación con el nitrógeno líquido resulta en alta tasa de enfriamiento (> 23,000 ° C) (Hajarian *et al.*, 2011). Por ello, el uso de este dispositivo es una técnica altamente eficaz para la criopreservación de ovocitos y embriones con altas tasas de supervivencia y desarrollo (Ruvalcaba *et al.*, 2009). A continuación se presenta en la Figura 6.

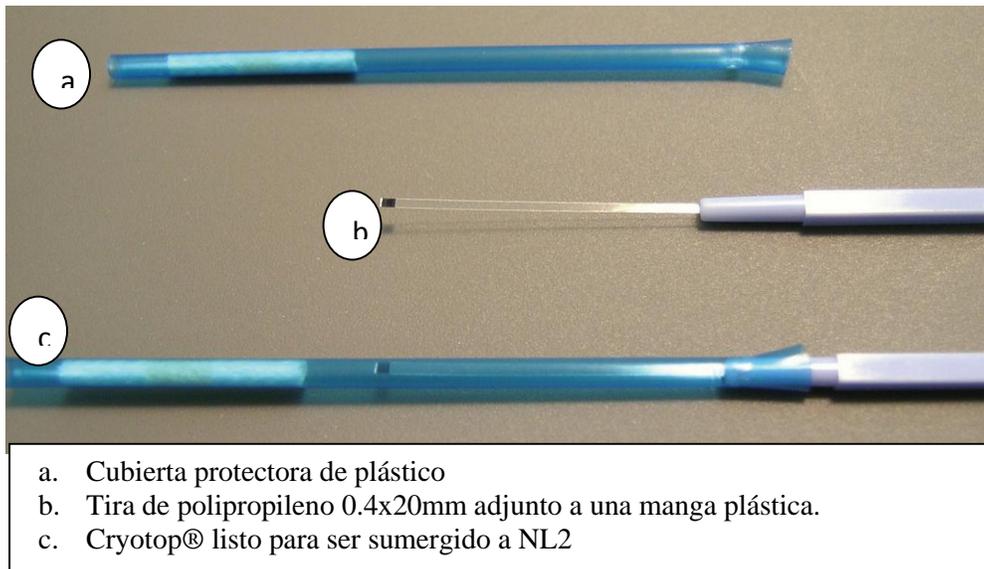


Figura 6: Dispositivo Cryotop® (Kuwayama *et al.*, 2005)

- **Dispositivo Cryotip®.** Los Cryotips son contenedores diseñados especialmente con puntas ultra finas que permite que el volumen que ingresa sea $< 1\mu\text{l}$, y la reducción de temperatura sea ultrarrápido, resultando una tasa de congelación de $20,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (AbdelHafez *et al.*, 2011). Además tienen una cubierta de metal que protege a los embriones y consecuentemente la solución conteniendo el embrión y el nitrógeno líquido es hermética durante el enfriamiento y el almacenamiento.

Por otra parte, aunque el aislamiento ligeramente bajó la relación del enfriamiento, los valores obtenidos con el Cryotip® fueron todavía lo suficientemente altos para obtener vitrificación apropiada (Kuwayama, 2005). Este producto se ha optimizado como sistema cerrado para procesos de criopreservación, como se muestra en la Figura 7.



Figura 7: Pajilla Cryotip®, (Irvine Scientific, CA, USA)

g. Viabilidad de embriones criopreservados

La viabilidad o vitalidad es la capacidad potencial del embrión de generar una gestación o la capacidad del embrión de continuar vivo o avanzar a la próxima etapa de desarrollo. Huang *et al.* (2006) evaluaron como supervivencia de vitrificación a los embriones rehidratados adecuadamente con zona pelúcida intacta así como los blastómeros, luego de la evaluación a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas de cultivo (38.5°C y en una atmósfera humedecida de 5% de CO₂ en aire) después de la extracción de crioprotectores a los embriones.

De Ben (1994) menciona que la evaluación morfológica y la clasificación embrionaria establecen patrones morfológicos que juzgan la forma, pero no la vida embrionaria. Sin embargo la evaluación morfológica de embriones a través del examen en microscopio estereoscópico con aumento entre 10 -100 veces, es aun bastante subjetiva. Por tanto, Gordon (1996) afirma que la eclosión puede considerarse como la clave del desarrollo del embrión. Por otro lado, Lonergan *et al.*, (2001), sugieren que la mejor medida de calidad del blastocisto es la habilidad para establecer una gestación y producir a un becerro.

Palma (2001) y Hafez (2002) mencionan que uno de los principales parámetros y procedimientos empleados para evaluar la supervivencia embrionaria en animales

domésticos se basa en características morfológicas antes y después de congelamiento y descongelamiento. Todos embriones soportan considerable daño morfológico y funcional durante la criopreservación (Kuwayama y Vajta, 2006). Avila-Portillo *et al.*, (2006) muestran que los períodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el período de retorno a condiciones fisiológicas.

Luego de la descongelación Desai *et al.*, (2013) realizaron una primera evaluación morfológica identificando embriones “poco sobrevivientes” (blastocistos con células oscuras, areas grandes de degeneración). Después los blastocistos fueron incubados por 2 horas y revisados antes de la transferencia, donde se evaluó la expansión del blastocele, trofoblasto y la masa interna de células (ICM) de los blastocistos, estas características morfológicas son estrechamente vinculadas, para la implantación exitosa de embriones en humanos. De igual modo AbdelHafez *et al.*, (2011), también realizaron una evaluación a las 3 h, asimismo Xu, (2006), realiza una primera evaluación a las 2 h, de la sobrevivencia, antes de T.E. en bovinos.

Además la sobrevivencia de los embriones sometidos a la criopreservación se puede evaluar mediante los parámetros de re-expansión de los embriones (Rizos *et al.*, 2003). Por tanto algunos investigadores recomiendan esta evaluación previa en los procesos de transferencia de embriones vitrificados, ya que esta propiedad de re-expansión se debe a la capacidad de osmosis, pasaje y consumo de nutrientes del medio que siguen realizando las células vivas, luego de la descongelación y la extracción de crioprotectores a través de la membrana plasmática (Mucci *et al.*, 2006).

Mucci *et al.* (2006), compararon la viabilidad, 72 horas después del descongelamiento embriones bovinos producidos *in vitro* criopreservados, obteniendo por vitrificación un 43 por ciento y por método convencional 12 por ciento, al igual Rodríguez y Bó (2011) también compararon las dos metodologías obteniendo 57 por ciento de viabilidad por vitrificación y 21 por ciento por método convencional.

2.2.3 Factores que afectan el éxito de la tecnología de embriones

- **Procedencia del embrión**

Entre los factores que afectan la tecnología de embriones, es la procedencia del embrión *in vivo* o producido *in vitro* (Palma, 2001; Massip, 2003), mostrándose en varios trabajos que los resultados de tasa de preñez luego de la transferencia de embriones congelados producidos *in vitro* son menores a los obtenidos con embriones obtenidos *in vivo* en bovinos (Palma, 2001). Asimismo, Pelaez (2011) menciona que en los embriones *in vitro* existe una escasa resistencia a la criopreservación, dificultando su conservación.

Esta deficiencia en la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, es menor probablemente debido a las características físicas propias de este tipo de embriones, que son más sensibles al momento de ser expuestos a bajas temperaturas o a los procesos de criopreservación, siendo las diferencias morfológicas y/o metabólicas, estructurales de las células (Vajta *et al.*, 1997; Guignot, 2005; Dinnyes y Nedambale, 2009), así como por las diferencias en la densidad de lípidos y proteínas (Palma, 2001).

- **Estado de desarrollo del embrión**

Massip, (2003) y Guignot, (2005) han demostrado que los embriones en las primeras etapas de desarrollo son muy susceptibles a la congelación, comparado a los embriones en estado de desarrollo mas avanzado como mórula y blastocisto, debido a que las blastómeras son más pequeñas, la pérdida de agua es más eficiente. Igualmente, Linder y Wright, (1983) reportaron que se logra mejores resultados en este orden: blastocistos expandido, blastocisto temprano y mórulas.

Por otro lado, Huang *et al.*, (2006) también mostraron las diferencias de la supervivencia de embriones caprinos vitrificados en los diferentes estadios como mórulas 80 por ciento, con blastocisto 80 por ciento, con blastocisto expandido 90.9 por ciento. De forma similar Hasler, (2011) menciona que las tasas superiores de preñez fueron logradas siguiendo transferencia de blastocistos expandidos comparadas con mórulas y blastocistos.

La sobrevivencia de embriones vitrificados producidos *in vitro* en varios estadios de desarrollo es diferenciado, siendo mas alto en la etapa de blastocisto 98.3 por ciento, mórula 60 por ciento (Tominaga, 2004). Similares resultados reporta Desai *et al.* (2013) de 66 por ciento de 27traw27tación con blastocistos expandidos/eclosionados y significativamente inferior con blastocisto temprano 47 por ciento, demostrando que los embriones en estado temprano de desarrollo son más susceptibles a daños por procesos de enfriamiento y calentamiento (Serrano *et al.*, 2002). Además estos resultados son respaldados por Gatica *et al.*, (2006) quienes sugieren vitrificar estados embrionarios avanzados, como blastocisto y blastocisto expandido obteniendo 81,9 y 96,7 por ciento respectivamente.

De igual modo, Nedambale *et al.*, (2004) compararon la edad del embrión al momento de vitrificar, obteniendo una sobrevivencia en embriones bovinos diferenciada por la edad del embrión de día 6.5 (68 por ciento), 7 (87 por ciento) y día 8.5 (49 por ciento) siendo la mayor tasa de embriones eclosionados en el día 7. Por ello Kasai, (1996) concluye que aún con el uso de crioprotectores adecuados durante la vitrificación, los resultados pueden comportarse diferentemente a merced de la etapa de desarrollo.

- **Calidad Embrionaria**

La calidad embrionaria es uno de los factores que afecta directamente al resultado de la transferencia, tomando los criterios mas usados como son las morfológicas que incluyen configuración, color, número y densidad de las células, tamaño del espacio perivitelino, etc. Y está relacionada con la viabilidad después de congelación, demostrando que la calidad del embrión es un predictor más exacto del éxito (Linder y Wrigth, 1983).

Palma (1993) ratifica que los embriones clasificados como excelentes o buenos tiene una alta probabilidad de alcanzar la preñez (60-70 por ciento), mientras los de muy baja calidad no concluyeron en preñeces. Nedambale *et al.*, (2004) también reportaron que los embriones al vitrificar de C1 (excelente y bueno) y C2 (regular), muestran diferentes tasas de sobrevivencia en blastocistos bovinos con 92 por ciento para C1 y 8 por ciento para C2.

- **Toxicidad de los crioprotectores**

El tiempo de estrategia de la exposición para evitar toxicidad de una solución de vitrificación será acortar el tiempo de exposición de embriones en la solución. Pero si la exposición es demasiado corto, entonces el empapamiento del crioprotector no será suficiente, y el hielo intracelular puede formarse aun si el hielo extracelular está ausente. Por consiguiente, el tiempo óptimo de exposición para la vitrificación exitosa debe ser un compromiso entre impedir la lesión tóxica y la formación de hielo intracelular (Kasai, 1996).

Kuwayama *et al.*, (2005); menciona que las velocidades de enfriamiento son imprescindibles para evitar la toxicidad y varían dependiendo el dispositivo y el volumen de solución vitrificante utilizado: pajillas de (25.0 μ l) logra una tasa de congelación 4460 $^{\circ}$ C/min, Open-pulled 28traw OPS (1.5 μ l) tasa de 16,340 $^{\circ}$ C/min, y con cryotop[®] (<0.1 μ l), de 22,800 $^{\circ}$ C/min, y con cryotip[®] (0.1 μ l) de 12 000 $^{\circ}$ C/min.

Se podría considerar por tanto como hace referencia Kuwayama *et al.* (2005), los factores determinantes en la obtención de mejores tasas de re-expansión *in vitro*, son las que logran altas tasas de congelación, menor volumen, concentración adecuada del crioprotector (viscosidad de la solución) y la tasa de enfriamiento mas rápida que traspase la barrera térmica de los 15 a -5 $^{\circ}$ C, evitando el máximo daño celular durante el proceso de vitrificación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar

La presente investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva “Carlos Rodríguez Villegas” del Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Lima, Perú (ver figura 8, acceso al laboratorio)



Figura 8. Laboratorio de biotecnología reproductiva – UNALM

3.2 Estandarización de protocolos

El procedimiento de producción de embriones *in vitro* fue realizado con protocolos y medios comerciales (Vitrogen®, Brasil) previamente testeados en el laboratorio central Cravinhos, Sao Paulo, Brasil, y enviados a los distintos laboratorios de fecundación *in vitro* que trabajan en integración horizontal en Brasil, Colombia, Bolivia, Perú, España, USA, Sudáfrica y otros.

3.3 Producción de embriones *in vitro* en bovinos

Comprendió las siguientes etapas:

a) **Recuperación de los ovocitos con complejo cúmulus oophorus (COCs).** Los ovarios de matadero fueron trasladados en un recipiente isotérmico al laboratorio como se observa en Figura 9^a. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio fue siempre inferior a 3 horas. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados 2 a 3 veces con solución fisiológica de 0,9% de NaCl a 35 °C y conservados en la misma solución. Los COCs fueron aspirados de los folículos entre 3 a 8 mm de tamaño con aguja 18G de 1 ½ pulgadas usando PBS suplementado con gentamicina 70ug / ml y 1% de suero fetal bovino. (ver figura 9 b).

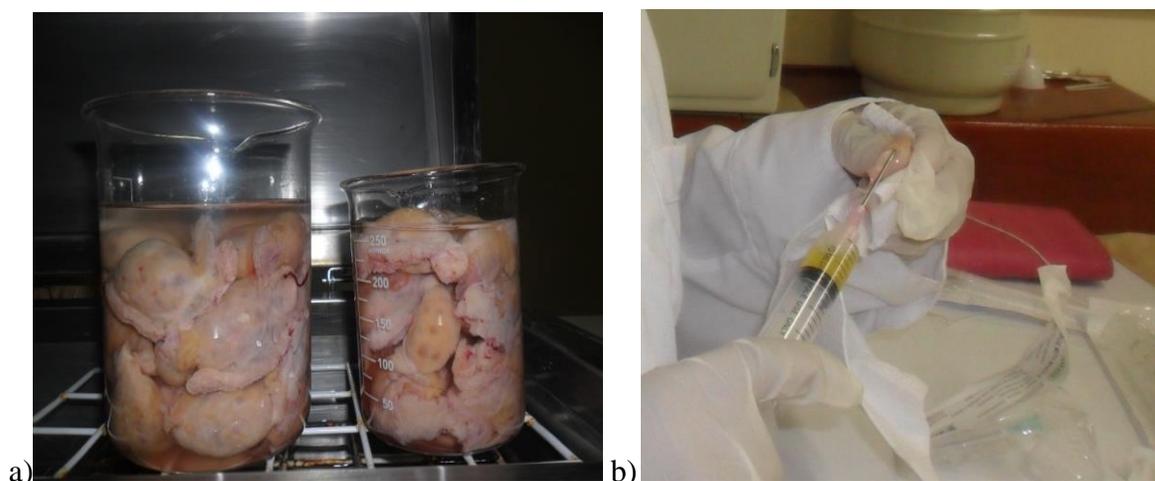


Figura 9. Recuperación de los COC's de ovarios de matadero, a) Ovarios de matadero en solución fisiológica temperada a 35 °C y b) Aspiración folicular con jeringa de 10cc y aguja 18G de 1 ½ pulgada.

Los COCs fueron visualizados bajo un microscopio estereoscópico entre 20 a 40X, inmediatamente transferidos a una placa de 35x10 mm (Falcon® 1008) conteniendo medio H-199® (Vitrogen, Brasil), para ser clasificados bajo un aumento de 40X. La evaluación y clasificación de los COCs fueron en base a la morfología dentro de 4 categorías, establecidos por Blondin y Sirad, (1995). Los COCs se clasificaron como viables (calidad A y B) y no viables (calidad C y D), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*.

b) **Maduración in vitro.** Después de la recuperación y clasificación, los COCs de grado A y B (viables) fueron lavados tres veces en medio transporte H-199® y tres veces en medio de maduración MIV® (Vitrogen, Brasil) previamente incubados a 38.5°C, 5% CO₂ y humedad 90% por 2 horas. Se colocaron 8 a 10 COCs por microgota de medio MIV® que previamente fue equilibrada o incubado.

La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 70 µl de medio de maduración MIV® cubierta con aceite mineral estabilizada (Sigma M3516) en placas 35x10 mm (Falcon® 1008) y llevados a incubación durante (22 a 24 horas) a 38.5°C y 5% CO₂ y 90 % Hd. (ver Figura 10)

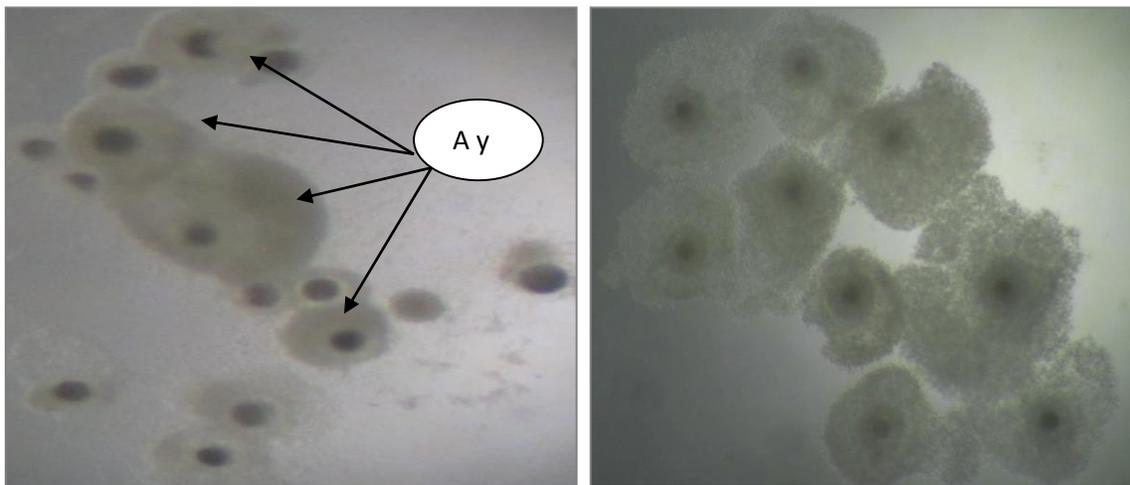


Figura10: a) COCs recuperados calidad A y B, b) COCs madurados por 22-24h

c) **Fecundación in vitro.** Después de las 22 a 24 horas de maduración, los ovocitos fueron retirados del medio de maduración y lavados tres veces en medio de fecundación FIV® (Vitrogen, Brasil) y seguidamente fueron colocados en grupos de 8 a 10 ovocitos en microgotas de 70 µl de medio de fecundación FIV® en placas de cultivo (Falcon® 1008) de 35x10 mm, cubiertos con aceite mineral, previamente incubados a 38.5°C y 5% CO₂ por 2 horas, posteriormente se adicionó 4 a 5 µl de suspensión de espermatozoide seleccionados y capacitados en medio FIV®. La preparación de los espermatozoides se realizó

descongelando una pajilla de 0,5 ml de semen congelado de toros de conocida fertilidad, en baño María a 37 °C por 20 segundos.

Para seleccionar y capacitar los espermatozoides se utilizó el método de Percoll 90/45, en un microtubo de 1,5ml donde se colocó 500 µl de Percoll 45 (Vitrogen®, Brasil) en el gradiente superior (rosado), 500 µl de percoll 90 (Vitrogen®, Brasil) en el gradiente inferior (transparente) y en la parte superior 200 µl de semen, se llevó a la primera centrifugación a 3000 RPM por 15 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, al pellet se le adicionó 500 µl de medio de fecundación FIV (Vitrogen®, Brasil) y nuevamente se llevó a centrifugar a 3000 RPM por 5 minutos. Seguidamente el pellet (porción rica en espermatozoides) se procedió a analizar la calidad y cantidad para estandarizar a una concentración final de 20×10^6 espermatozoides móviles por ml, siendo la dosis espermática 4 a 5 µl (8 a 10,000 espermatozoides por ovocito).

d) *Cultivo in vitro.* Aproximadamente 18 horas post inseminación, se desnudaron los ovocitos casi completamente por pipeteo en las mismas gotas de medio de fecundación y se lavaron tres veces en medio de cultivo CIV (Vitrogen®, Brasil) antes de transferirlos a microgotas de medio de cultivo CIV de 70 µl (8 a 10 ovocitos), cubiertas de aceite mineral. Las placas de cultivo 35x10mm (Falcon®, 1008) fueron incubadas a 38,5°C, 5% CO₂, >85% de humedad. A las 48 horas del cultivo se realizó la primera renovación del 50% de medio de cultivo CIV® y la evaluación de división embrionaria, así mismo se retiró el restante de las células del cúmulus. El día 4 del cultivo se realizó la segunda renovación del 50% de medio de cultivo CIV®. Posteriormente para el día 6 de cultivo (día 7, de fecundación) se obtuvieron los embriones en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido, como se muestra en la Figura 11.

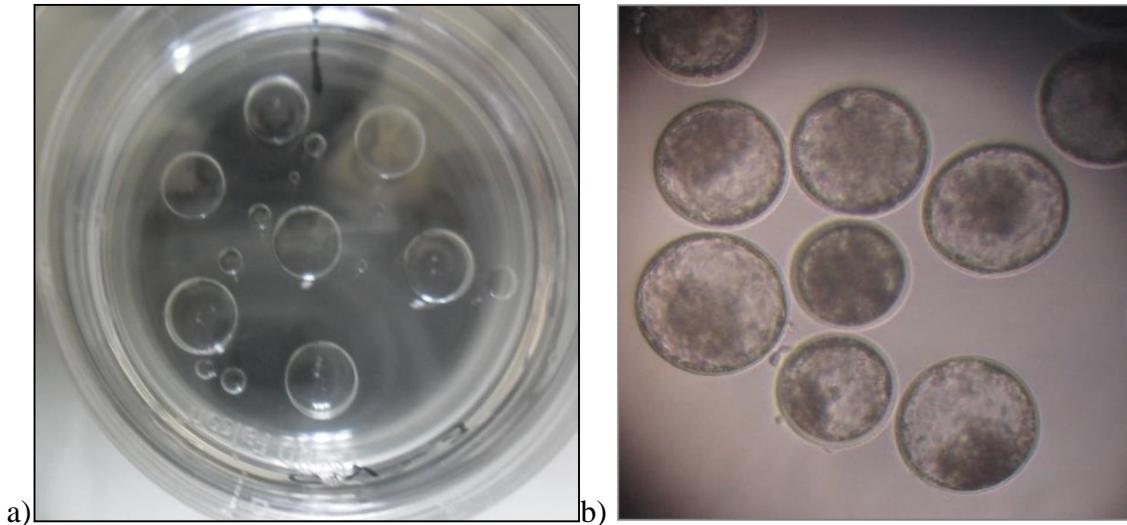


Figura 11: Producción *in vitro* de blastocistos a) Placas de 35x15mm, gotas de cultivo con CIV (izquierda) y b) Blastocisto día 7, post fecundación *in vitro* de calidad 1 y 2

3.4 Dispositivos de vitrificación

La baja tasa de sobrevivencia embrionaria post vitrificación (28.6 por ciento) utilizando un sistema cerrado con pajillas de 0.25cc en una investigación anterior (Condori, 2013) nos llevó a buscar sistemas cerrados que no se contaminaran con nitrógeno líquido y pueda aplicarse la vitrificación con volúmenes muy bajos ($<1\mu\text{l}$) conteniendo al embrión y logren tasas de enfriamiento superiores a $20,000\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto.

Los dispositivos de vitrificación que utilizamos en este experimento fueron elaborados en el laboratorio de biotecnología reproductiva, con materiales del mismo y fueron expuestos a luz ultravioleta para su esterilización, antes de usar y tenían las siguientes características:

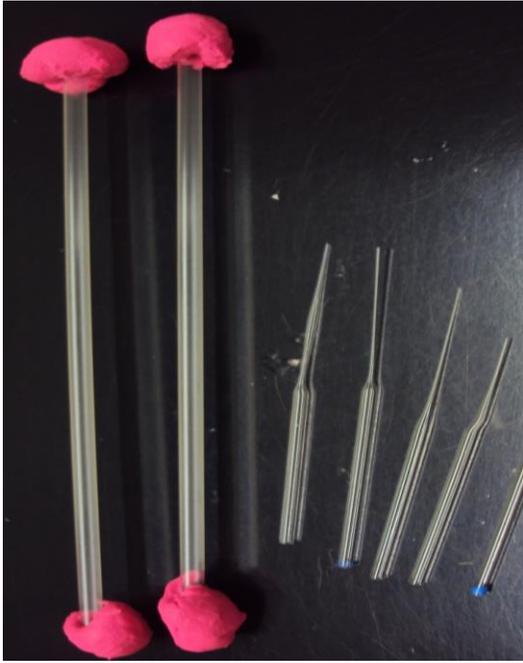
a) Vitri-tip

Se utilizaron capilares finos de vidrio de alta calidad Marienfeld®, aprobados para uso *in vitro*, los cuales fueron expuestos a llama de mechero de alcohol y sujetando con una pinza por un extremo, esta fue estirada controladamente, afinando el diámetro del tubo de vidrio de 0.6 mm hasta un diámetro de 0.2 mm (aprox), convirtiendo su contenido en ese extremo un bajo volumen $< 1\mu\text{l}$. Adicionalmente, se prepararon pajillas de 0.5cc como contenedor

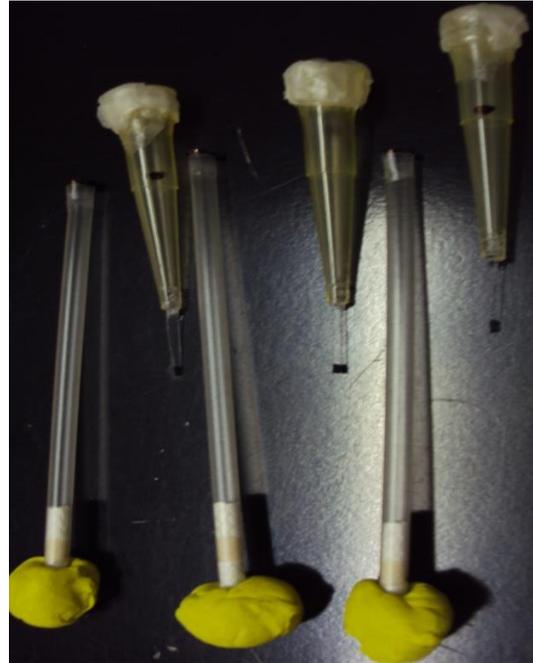
del vitri-tip (sistema cerrado), retirando la parte del sellado (algodón y alcohol polivinílico), sellando por un extremo con una masa elástica adhesiva «limpiatipo». Inmediatamente, al cargado de los embriones en mínimo volumen de medio de vitrificación (V2) son introducidos en contenedores (pajillas previamente preparadas) y selladas por el otro extremo con otra bola de mas elástica y darle un peso adecuado, para luego sumergirlo en Nitrógeno líquido hasta su evaluación.

b) Vitri-top

Las puntas amarillas (Tips) de 100 a 200 μ l de las micropipetas volumétricas, fueron preparadas, enlazando láminas delgadas de polietileno transparente de 1.5cm de largo x 0.1cm de ancho a la punta de estos tips. El extremo de la lámina de plástico fue marcado con tinta indeleble siendo el lugar que ocuparán los embriones. Adicionalmente, se prepararon una pajillas de 0.5cc como contenedor de Vitri-top (sistema cerrado), sellando por un extremo con una bola de «limpiatipo», y darle un peso adecuado. Al igual que en Vitri-tip los embriones fueron cargados en muy bajo volumen ($< 1 \mu$ l) de medio de vitrificación (V2) y sumergidas en nitrógeno líquido hasta su evaluación.



a) Vitri-tip



b) Vitri-top

Figura 12: Dispositivos cerrados para vitrificación, elaborados en laboratorio

3.5 Vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*

Para este procedimiento, solo los embriones (blastocistos) de calidad excelente y buena fueron seleccionados para el proceso de vitrificación. Los medios utilizados en este proceso de vitrificación tenían la siguiente formulación (ver Tabla 7)

Tabla 7: Medios utilizados en el proceso de vitrificación y desvitrificación

Procedimientos	Descripción de los medios	Crioprotectores
Vitrificación	V1: Sol. de equilibrio	7.5% DMSO + 7.5% EG+ 20%SPS
	V2: Sol. de Vitrificación	15% EG, 10 mg/ml Ficoll-70 y 0.65 M sucrosa a 27°C.

Desvitrificación	D1: Sol. descongelación	Soluciones de 20% SPS de Medio Global y concentraciones decrecientes de Sucrosa (0.25 M y 0.125 M) a 37°C
	D2: Sol. de dilución	
	D3: Sol. de lavado	
Cultivo blastocistos	CIV: Medio de cultivo	Medio CIV (Vitrogen®, Brasil)

DMSO: Dimetilsulfoxido, EG: Etilenglicol, SPS: Serum Protein Substitute

Para el proceso de vitrificación los blastocistos fueron colocados en la solución de equilibrio V1 (Vitrogen® Brasil) a una temperatura de 27°C por 8 minutos, durante este tiempo los embriones reposaron en una microgota y luego fueron transferidos a otra microgota con medio de vitrificación V2 (Vitrogen® Brasil) por 1 minuto, donde reposaron hasta el cargado en el dispositivo, protocolo similar al empleado por Asgari, (2009), los blastocistos fueron cargados al azar en solución menor a 0.5 µl, en dos grupos: (1) dispositivo Vitri-tip, por capilaridad; (2) Vitri-top, en una lámina de polietileno eliminando el exceso de solución vitrificante dejando sólo una capa delgada y el embrión.

Los dispositivos de vitrificación conteniendo al blastocisto fueron introducidos a contenedores preparados con pajillas de 0.5cc y «limpiatipo», para finalmente ser sumergidos, el esquema se muestra en la figura 13.

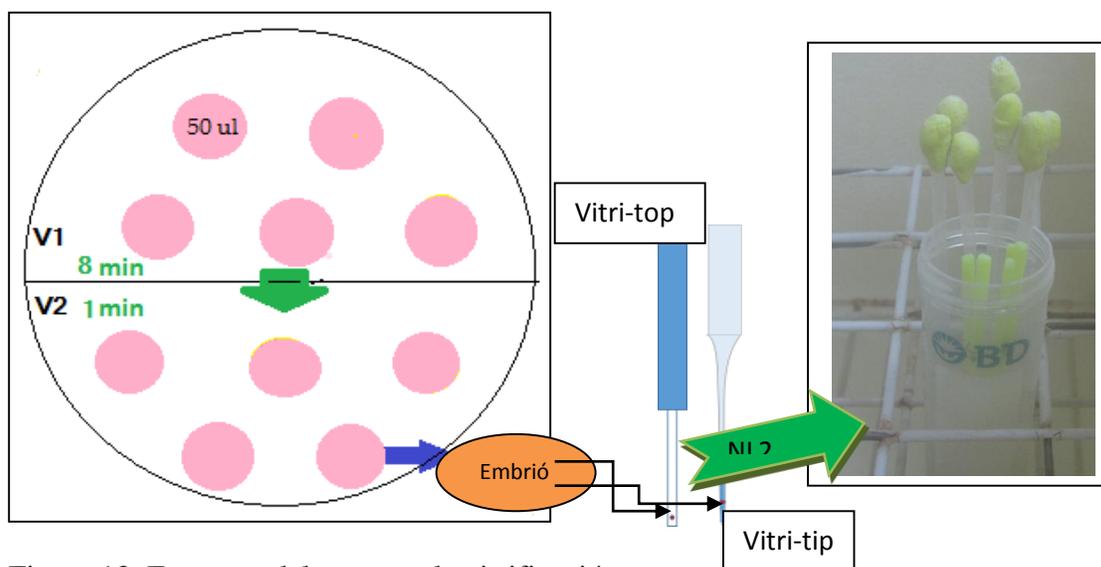


Figura 13. Esquema del proceso de vitrificación.

3.6 Evaluación de la criosobrevivencia de embriones y la tasa de recuperación

Para el proceso de la descongelación se retiró la cubierta protectora exponiendo los blastocistos vitrificados a soluciones secuenciales de descongelación, en D1 por 1 minuto, dentro de la incubadora a 38 °C con 5% CO₂, posteriormente se trasladó a temperatura de ambiente y donde D2 y D3, reposan en platina caliente a 27°C, el tiempo que los blastocistos permanecieron en solución de dilución D2 fue durante 3 minutos y finalmente fueron trasferidos al medio de lavado D3 por 5 min, posteriormente los embriones se trasladaron a medio de cultivo CIV, donde los blastocistos fueron lavados, a continuación se trasladaron a una placa con 4 microgotas de medio CIV cubierto con aceite mineral, y posteriormente fueron llevados a la incubadora por un periodo de 3 horas para evaluar sobrevivencia embrionaria por re-expansión del blastocisto vitrificado y retorno a su tamaño original, como se muestra en la figura 14.

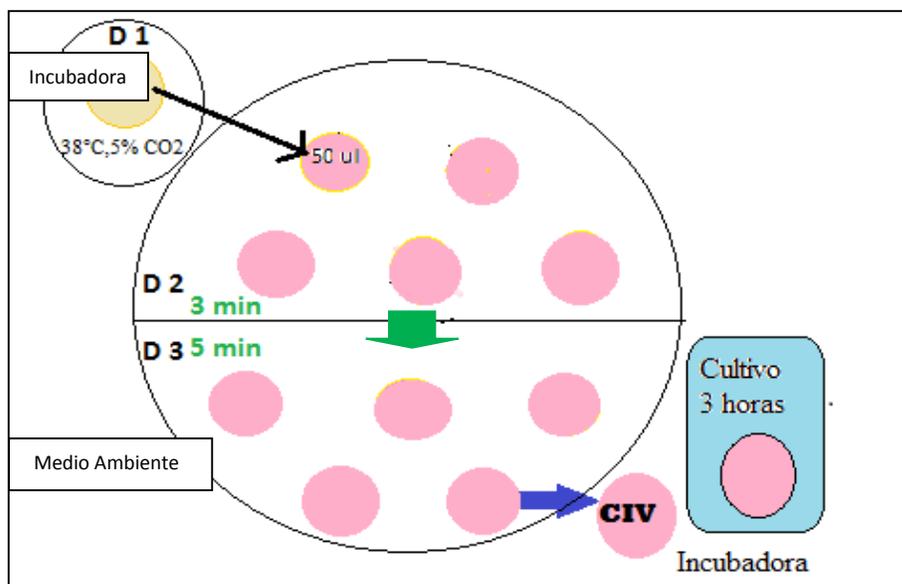


Figura 14. Esquema del proceso de descongelación.

3.7 Diseño experimental

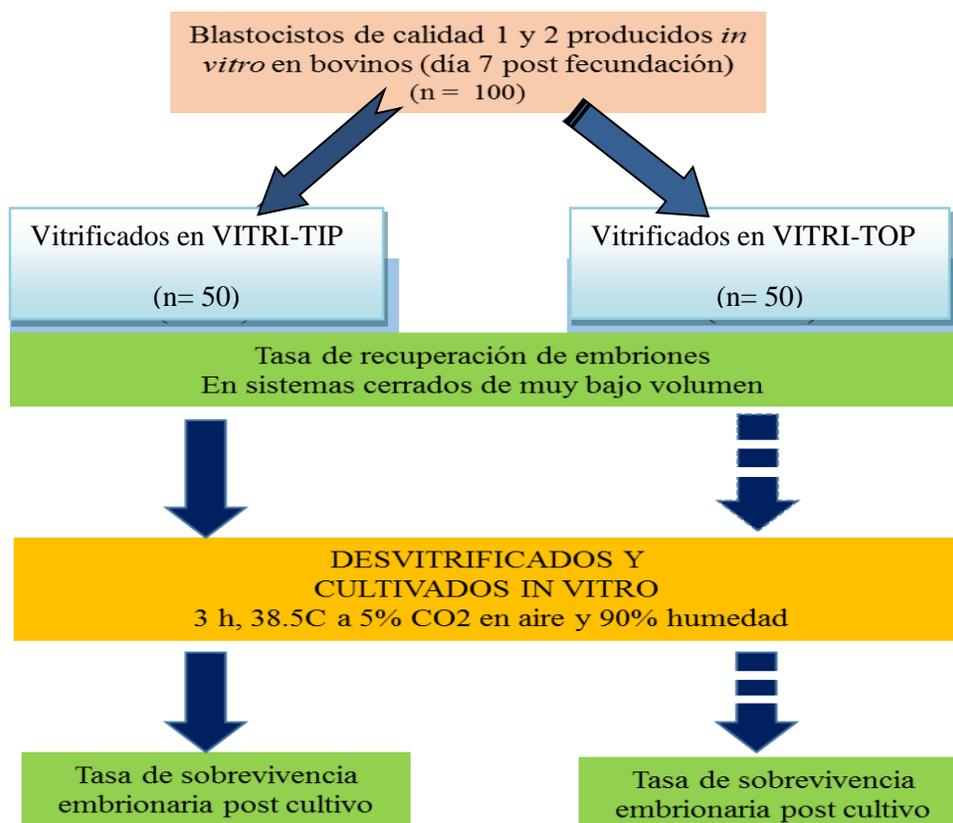


Figura 15. Diseño experimental de supervivencia embrionaria en dos tipos de dispositivo.

3.8 Análisis estadístico

Los parámetros evaluados para ambos sistemas de vitrificación fueron las tasas de recuperación postdescongelamiento y la tasa de re-expansión *in vitro* a las 3 h de cultivo post descongelación. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de Chi-cuadrado, el índice de significancia fue establecido en $p < 0.05$, y se asumió la siguiente hipótesis.

Ha: $T1 \neq T2$

Ho: $T1 = T2$

T1: Vitrificación de blastocistos bovinos con el uso del dispositivo Vitri-tip.

T2: Vitrificación de blastocistos bovinos con el uso del dispositivo Vitri-top.

Formula:

$$X^2 = \frac{\sum [(O_i - E_i)]^2}{E_i} \sim X^2_{(k-1, \alpha)}$$

Donde:

O_i: Frecuencia observada en la vitrificación con dispositivo Vitri-tip.

E_i: Frecuencia esperada en la vitrificación con dispositivo Vitri-top.

k: Numero de tratamientos

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la ejecución del presente experimento, se realizaron 06 sesiones de producción de embriones *in vitro*, a partir de ovarios de camal, utilizando un total de 415 COC's, se produjeron 113 blastocistos, con una eficiencia de 29 por ciento de blastocistos de ovocitos madurados al día 7, post fertilización (ver tabla 8).

Tabla 8: Eficiencia en la producción de embriones *in vitro* en bovinos, con ovarios de matadero.

Sesión	# ovarios	# COC's tipo AyB	# COC's para IVM	Blastocistos (día, 7)	Tasa de blastocistos	Toro usado en IVF
1	14	3.4	48	14	29.8	Predilecto
2	16	2.8	44	15	34.09	Predilecto
3	27	3.6	98	12	12.24	Predilecto
4	24	2.6	62	24	38.7	Mistiano
5	28	2.8	79	31	39.2	Mistiano
6	27	3.1	84	17	20.24	Mistiano
Promedio	23	3.1/ovario	71	19	29.05%	

Como se observa solo un tercio de los ovocitos madurados *in vitro* desarrollaron a la etapa de blastocisto, estos resultados son corroborados por (Farin *et al.*, 2001; Mucci *et al.*, 2006) quienes mencionan que solo la tercera parte de los COCs llegan a la etapa de mórula o blastocisto, y sin importar si son fertilizados *in vivo* o *in vitro*, siendo las tasas de producción en promedio luego del cultivo *in vitro* por 6 y 7 días, del 25 a 40 por ciento. Del mismo modo Herradón *et al.*, (2007), también mencionan que los ovocitos capaces de transformarse en blastocisto transferibles se ha mantenido entre 30 y 40 por ciento.

Nuestros resultados obtenidos son similares a los reportados por Gomez *et al.*, (2008), donde la eficacia de los sistemas de producción de embriones bovinos *in vitro* oscila entre un 30 y

40 por ciento de blastocistos con calidad suficiente para ser transferidos sobre el total de los ovocitos puestos en cultivo. Similares datos reportan Park *et al.*, (2005) de ovocitos madurados *in vitro*, obteniendo 15-40 por ciento blastocistos. Confirmando de con estos reportes que existen variabilidad de resultados, esto posiblemente se debe a la desventaja que tienen los embriones procedentes de matadero, que no sobreviven de igual forma que los embriones producidos *in vivo* (Lonergan y Fair, 2008).

Aunque hay evidencias que las condiciones de cultivo postfecundación son determinantes para la calidad de los embriones obtenidos (Lonergan *et al.*, 2001), hay que señalar que la eficiencia de la producción de embriones *in vitro* esta ligada no solo al sistema de cultivo, sino a la calidad intrínseca de los ovocitos, habiendo muchos ovocitos inmaduros provenientes de camal, manifestandose en la expresión de morfología, de metabolismo y criotolerancia, tener un efecto disminuido en el desarrollo (Rizos *et al.*, 2008).

4.1 Eficiencia del uso o tasa de recuperación de dispositivos Vitri-top y Vitri-tip en la vitrificación de embriones.

En el trabajo, se vitrificaron 100 blastocistos bovinos, siendo divididos 50 embriones en dispositivos vitri-tip y 50 embriones en dispositivos vitri-top, distribuidos al azar a los grupos de criopreservación. El manejo de muy bajo volumen (<1µl) en los sistemas de vitrificación presenta algunas pérdidas de embriones, las cuales deben ser lo menos posible (ver figura 16). La tasa de pérdidas de embriones, durante el proceso de vitrificación y descongelación fue de 10 embriones (10 por ciento), siendo esta catalogada como una tasa reducida de pérdida (ver tabla 9)

Tabla 9. Tasas de recuperación de embriones vitrificados en dispositivos Vitri-tip y Vitri-top.

Dispositivo de vitrificación	Embriones en estado blastocisto	Tasa de recuperación (%)
Vitri-tip	50	46 (92 %)a
Vitri-top	50	44 (88 %)a

Las comparaciones son en forma vertical, letras iguales significa que no existen diferencias significativas a, b ($p < 0.05$)

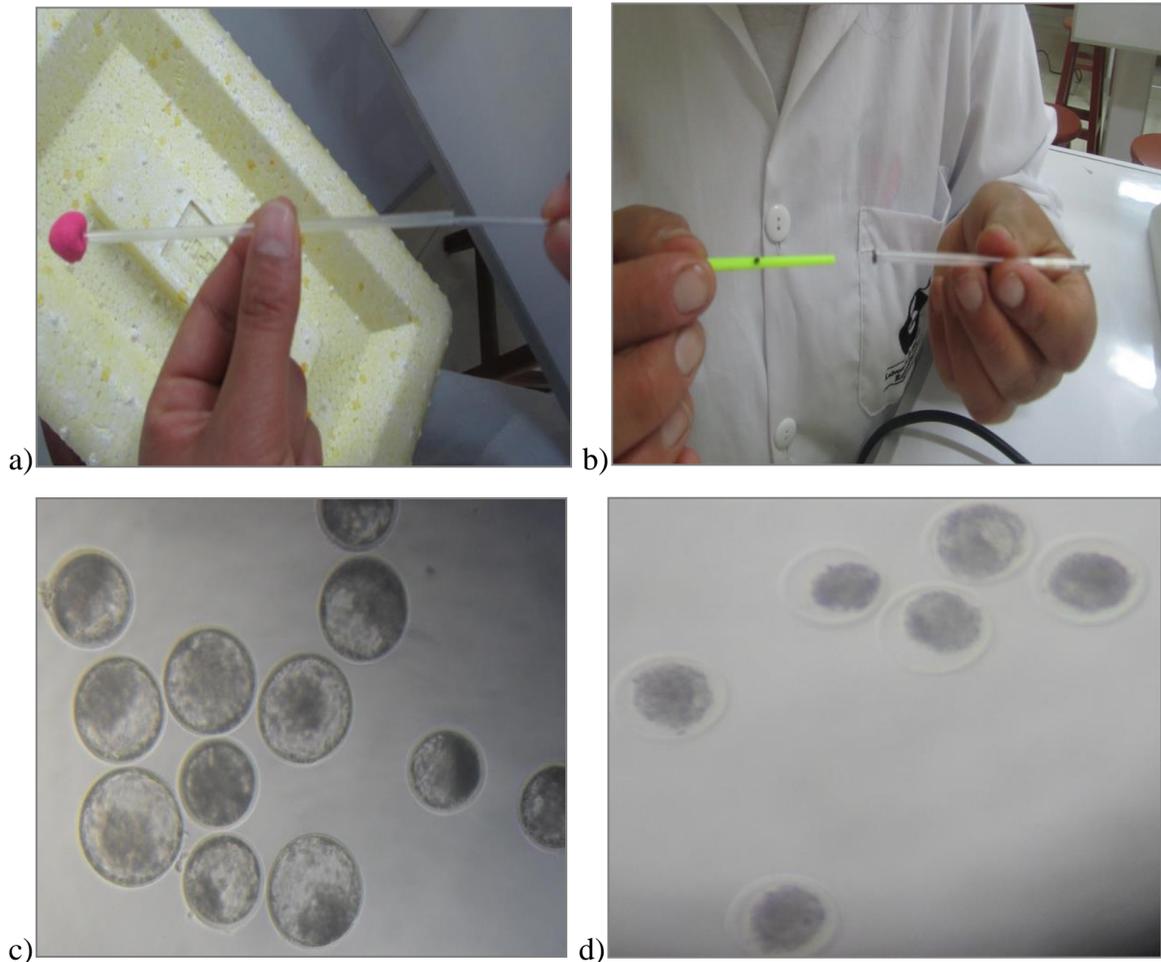


Figura 16. Imágenes de cargado de dispositivo Vitri-tip, Vitri-top (a y b) y colocación del dispositivo en una pajilla, c) blastocistos expandidos listos para la vitrificación d) blastocistos en proceso de descongelación.

Los resultados de ambos tratamientos no demuestran gran variación en la tasa de pérdida embrionaria por manejo de bajo volumen. En los dispositivos Vitri-tip la tasa de recuperación fue 92 por ciento, similar al resultado obtenido con el uso de otro dispositivo de similar volumen como el cryotip®, reportados por AbdelHafez *et al.*, (2011) y Banti, (2014) con una tasa de recuperación del 85 por ciento y 74.6 por ciento respectivamente.

Nuestros resultados obtenidos en la tasa de recuperación con el dispositivo Vitri-top fue 88 por ciento, mostrándose ligeramente inferior con relación a otros dispositivos modernos también de mínimo volumen como cryoloop® con 100 por ciento de tasa de recuperación publicado por AbdelHafez *et al.*, (2011), y con este mismo dispositivo Desai *et al.*, (2013) logró un 99 por ciento. Asimismo el Vitri-top fue inferior también comparado a dispositivo con mínimo volumen como el rapid-i® con la cual Desai *et al.*, (2013) logró un 99 por ciento de recuperación y Banti, (2014) obtuvo con rapid-i® 97.1 por ciento.

Como se observa nuestra tasa de pérdida fue mínima, sin embargo estas pérdidas, se debió probablemente a la dificultad en el manejo de volúmenes tan pequeños (0.5 µl), lo que permitió que los embriones se adhieran a la superficie del dispositivo y no se logre ubicar al momento de la descongelación. Sin embargo nuestros resultados fueron superiores a la tasa de recuperación con pajuelas convencionales de mayor volumen (pajuela sellada 0.25ml) donde lograron 85.7 por ciento y similares a pajuela abierta OPS (5 µl) con un 91.5 por ciento (Gutierrez, 2004) mostrando con ello que nuestros dispositivos si pueden ser empleados sin el riesgo de perdidas de embriones u ovocitos.

Otra razón que explica nuestra tasa de pérdidas al momento de descongelación se debió a la reciente implementación de la vitrificación al laboratorio, y siendo las soluciones de vitrificación muy viscosas, la manipulación de las microgotas junto a los embriones mostraron un grado dificultad.

Por tanto nuestros resultados están conformes con los resultados observados por otros autores, que usaron diferentes dispositivos o envases para criopreservar embriones, siendo estos dispositivos seguros, que evitaría cualquier riesgo de contaminación que comprometa la supervivencia y las tasa de desarrollo *in vitro*.

4.2 Supervivencia embrionaria por re-expansión a 3 horas post descongelación de los blastocistos bovinos producidos *in vitro*

Se lograron recuperar 46 blastocistos en sistema Vitri-tip y 44 en sistema Vitri-top, siendo estos cultivados *in vitro* en condiciones controladas de temperatura 38.5°C, 5% de CO₂ y >90% de humedad relativa. La tasa de re-expansión (supervivencia) de blastocistos vitrificados no mostraron diferencias significativas entre ambos dispositivos ($p > 0.05$) (ver tabla 10), indicando de esta manera que siempre existe un deterioro de los embriones como resultado del proceso de la vitrificación y descongelación, que podría comprometer su capacidad implantatoria en el útero de la receptora (ver la figura 17).

Tabla 10: Tasa de re-expansión a 3 h post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro*

Dispositivo de Vitrificación	Blastocistos cultivados (n)	Re-expandidos en cultivo <i>in vitro</i> a 3h, n (%)
Vitri-tip	46	24 (52) ^a
Vitri-top	44	21 (48) ^a

Las comparaciones son en forma vertical, letras iguales significa que no existen diferencias significativas a, b ($p < 0.05$)

Nuestros resultados con el protocolo de vitrificación aplicado, difieren con resultados obtenidos por otros investigadores con dispositivos similares en volumen como; Desai *et al.*, (2013) quienes reportan altas tasas de re-expansión a 2 h de cultivo en humanos con el dispositivo Rapid-i®, 99 por ciento y 96 por ciento con cryoloop®. Asimismo nuestras tasas de supervivencia también fueron inferiores a los reportados por Kuwayama *et al.*, (2005) quienes obtuvieron tasas de supervivencia de blastocistos vitrificados con cryotip® 93 por ciento y cryotop® 97 por ciento a 3-4 h de cultivo *in vitro*. Del mismo modo Xu, (2006) mostró tasas de supervivencia mayores con la vitrificación en microdoplet a las 2 h, 93.1 por ciento, y por último AbdelHafez *et al.*, (2011) obtuvieron una tasa re-expansión a 3 h en Cryoloop® 100 por ciento, HSV® 100 por ciento y cryotip® 79 por ciento.

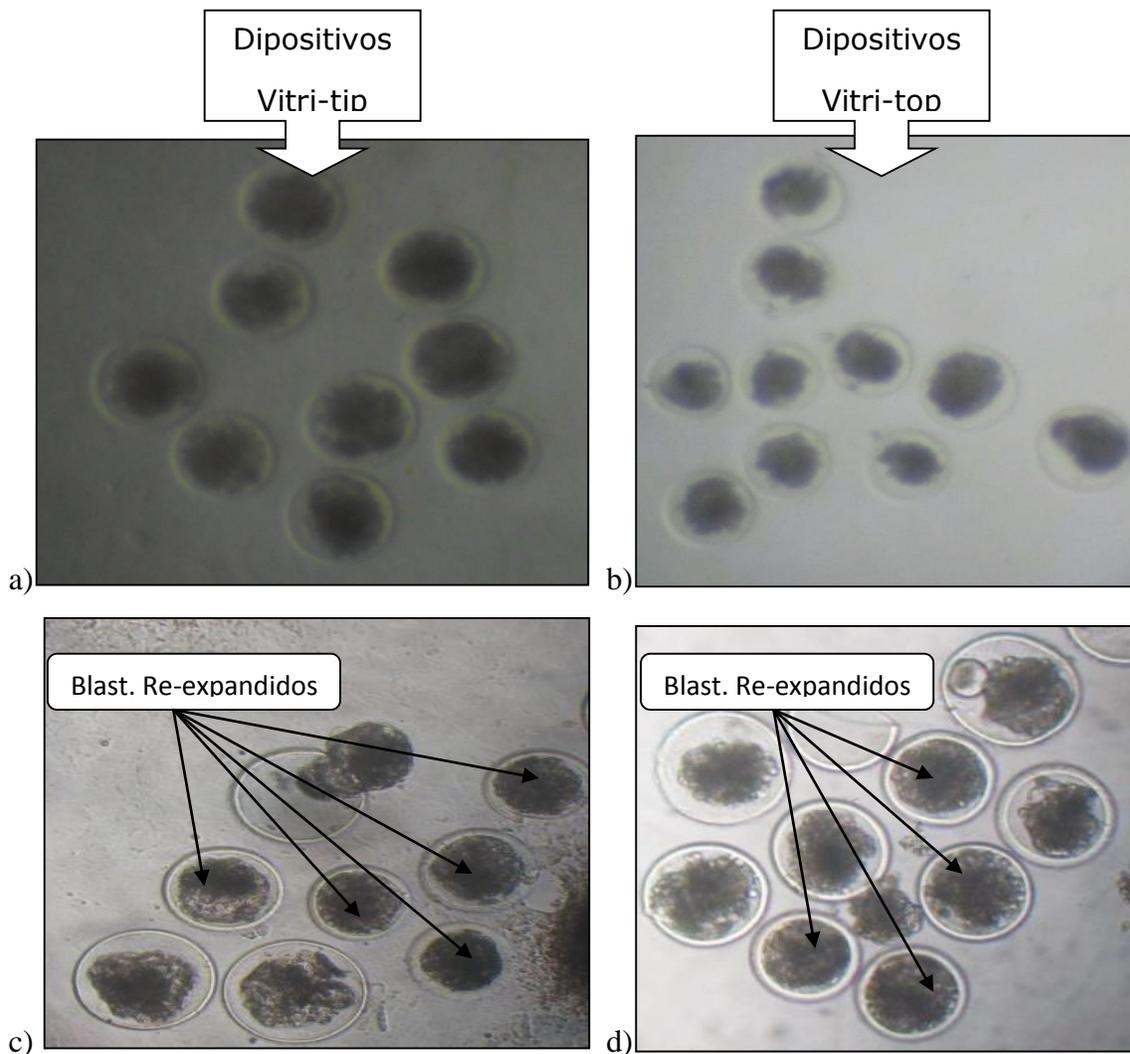


Figura 17. Blastocistos vitrificados y cultivados *in vitro*, a) y b) blastocistos durante la descongelación, c) y d) blastocistos descongelados y cultivados *in vitro* por 3 h.

Sin embargo nuestros resultados son comparables a los obtenidos por otros investigadores que han utilizado técnicas similares de vitrificación como Valbuena *et al.*, (2012) quienes obtuvieron tasas de sobrevivencia de blastocistos humanos vitrificados a las 24 h post cultivo con cryotop® 22.78 por ciento y 53.77 por ciento con cryotip®, y también experimentaron con blastocistos de ratones obteniendo tasas de sobrevivencia de 38.46 por ciento con cryotop® y 85.41 por ciento con cryotip®. Asimismo Asgari, (2009) también reportó con dispositivo cryotip®, 78.5 por ciento de sobrevivencia en Bovinos a 48 h de cultivo, y por último Banti (2014) igualmente reporta en embriones humanos vitrificados tasas de

sobrevivencia en cryotip® 67.3 por ciento, mostrando con ello la variabilidad de los resultados en el proceso de la vitrificación.

La baja respuesta de sobrevivencia embrionaria post descongelación, tanto el Vitri-tip y Vitri-top pudo deberse a múltiples factores como son: la procedencia de los ovocitos de camal, selección de COCs, la calidad de los embriones utilizados, etapa de desarrollo, tipo de crioprotectores usados, parámetros de enfriamiento y calentamiento, la toxicidad de la solución, deshidratación celular, daño del hielo intracelular, fractura y shock osmótico, los tiempos de reposo en los medios de vitrificación, los materiales utilizados, la esterilidad del ambiente y la temperatura (Kasai, 1996; Kuwayama *et al.*, 2005, He *et al.*, 2008).

En esta investigación aproximadamente el 50 por ciento de embriones sufrieron daños, lo que no permitió que se re-expandieran, este deterioro en su viabilidad fue posiblemente causado por el shock osmótico, ya que inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la exposición de los crioprotectores y después se hidratan a la descongelación, perdiendo la forma del embrión, conllevando a un desequilibrio de las soluciones intra y extracelulares, asimismo de las respuestas químicas y osmóticas ocasionando que los embriones se encuentren contraídos por la pérdida de agua, y no vuelvan a su forma inicial (Rall y Fahy, 1985; Ávila-Portillo *et al.* 2006).

Otra desventaja posible fue criopreservar embriones producidos *in vitro*, y COCs procedentes de camal siendo estos más susceptibles a la criopreservación, comparado a los embriones producidos *in vivo*, podemos explicar este comportamiento relacionándolo con características embrionarias publicadas en (Vajta *et al.*, 1997; Palma, 2001; Guignot, 2005; Dinnyes y Nedambale, 2009; Pelaez, 2011 y Seidel, 2012) quienes indicaron que en los embriones producidos *in vitro*, hay menor densidad de blastómeros, mayor tendencia a la formación de hielo intracelular, mayor presencia de micro gotas citoplasmáticas de lípidos y proteínas, las cuales modifican las características de comportamiento físicas y funcionales tanto de las membranas de las blastómeras como de la zona pelúcida lo que los hace más sensibles al enfriamiento y a la invasión de virus, bacterias y hongos, disminuyendo de esta forma las tasas de sobrevivencia de los embriones *in vitro*.

La selección de embriones también pudo haber influenciado en los bajos resultados ya que, como se mencionó, se seleccionaron blastocistos expandidos de calidad 1 y 2 (utilizado en embriones producidos *in vivo*), sin embargo esta selección subjetiva pudiera no ser la idónea para seleccionar por su calidad, siendo los embriones *in vitro* más oscuros debido al incremento en el volumen de lípidos, aunque Van Soom, (2003) menciona que el color del embrión es una herramienta para seleccionar embriones de buena calidad, además un indicador de la crioresistencia, nuestros embriones mostraron luego de la vitrificación una apariencia oscura, que podría deberse a la baja calidad de las blastómeras en cuanto a su organización celular, además por las lesiones fatales en muchas de ellas como menciona Serrano, (2002) reflejando como resultado una baja tasa de sobrevivencia.

Por otra parte, la formación de hielo intracelular como se sabe también es fatal para la célula durante la vitrificación, aunque no debe ocurrir comparado a la congelación convencional. Sin embargo, durante la manipulación de los embriones se cometió algunos errores en la toma del tiempo óptimo durante la exposición del embrión en las soluciones de congelación y descongelación, que fueron determinantes en la obtención de los resultados, por ello suponemos que hubo algunos desequilibrios en las concentraciones de los crioprotectores dentro y fuera del embrión, conllevando a una lesión tóxica o una escasa crioprotección celular, permitiendo la formación de hielo intracelular (Kasai, 1996).

Las tasas de enfriamiento logrado con nuestros dispositivos cerrados fueron ligeramente disminuidas debido a la cobertura (pajilla 0.5cc) que poseían como protección ante el contacto directo con el Nitrogeno Líquido. Aunque Kuwayama (2005) y Desai *et al.* (2013) mencionan que los protocolos de vitrificación son el logro de tasas de enfriamiento suficientemente altas en dispositivos de congelación, y descongelación como de 12,000 y 24,000 °C/min con el cryotip®, y 23,000 y 42,000 ° C/min con el método cryotop®. Por tanto suponemos que nuestra velocidad de congelación y descongelación, pudo no llegar a la velocidad requerida y ser letal para las células, permitiendo formación de cristales de hielo (AbdelHafez *et al.*, 2011).

Respecto a la etapa de desarrollo del embrión nosotros empleamos blastocistos expandidos logrados al día siete, recomendado por distintos investigadores como Linder y Wrigth,

(1983), Huang *et al.*, (2006) Gatica *et al.*, (2006), Hasler (2011), Desai *et al.*, (2013), lo cual nos permitió seleccionar embriones competentes y de mejor calidad comparados a los embriones que aún se encontraban en etapas más tempranas al mismo tiempo, aunque esta selección representó solo un 30 por ciento aproximadamente del total de COCs inicialmente cultivados, al parecer a contribuido positivamente en los resultados de nuestra investigación.

Cabe destacar la ventaja que ofreció el Vitri-tip es la facilidad de cargado de los embriones al interior de la pajuela para la vitrificación, respecto al Vitri-top, puesto que solo requiere del contacto directo del extremo delgado de la pajuela, donde por efecto de la capilaridad el embrión asciende al interior de la pajuela, en cambio la vitrificación con Vitri-top se necesita de materiales de ayuda para el cargado, y práctica del operador, pero ambos dispositivos evitaron la contaminación del embrión al contacto directo con el LN2.

En general la vitrificación es una técnica simple, rápida y menos costosa que el método congelamiento convencional, ya que se prescinde del uso de equipos costosos requeridos para los programas de congelación tradicional, además como mencionan Gatica *et al.*, (2006) mediante la vitrificación se pueden transferir más embriones por unidad de tiempo, con un porcentaje más que aceptable de gestaciones comprobadas a los 60 días.

Hasta el momento los resultados de la viabilidad posdescongelación de embriones vitrificados en la ganadería son variables, por ello se sigue realizando mas investigaciones para mejorar las técnicas, cabe destacar que actualmente tambien se está empleando esta técnica a mayor escala en la reproducción asistida en humanos y con muy buenos resultados, lo cuál permitirá con el tiempo perfeccionar las metodologías de trabajo en el campo.

V. CONCLUSIONES

- El resultado del método de vitrificación aplicado con los dispositivos cerrados como vitri-tip y vitri-top no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), ya que no hubo divergencia en la tasa de re-expansión *in vitro* a las 3 horas post descongelación entre ambos métodos.
- La tasa de recuperación de los dispositivos cerrados vitri-tip y vitri-top, fueron 92 por ciento y 88 por ciento respectivamente y no mostraron diferencias significativas con ($p > 0.05$), entre ambos tratamientos.

VI. RECOMENDACIONES

- Los dispositivos usados en la investigación como Vitri-tip y Vitri-top deben ser evaluados con más pruebas y utilizarlo como alternativa sencilla y menos costosa para la criopreservación de embriones en el campo y a su vez minimizar los riesgos de contaminación durante el almacenamiento.
- Realizar investigaciones para estandarizar los protocolos de vitrificación y tasas de supervivencia que impliquen determinarlas con tinción vital.
- Elaborar medios propios en laboratorio, para vitrificación, descongelamiento y cultivo de embriones con el propósito de minimizar los costos en la producción *in vitro*.
- Comparar la eficiencia de la técnica de vitrificación respecto al método de congelación convencional, en la tasa de supervivencia embrionaria y empleando embriones producidos *in vivo*.

VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- **Albarracín MJ. 2005.** “Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled Straw: Estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*” Tesis Doctoral. España. Universidad Autónoma de Barcelona. 90p.
- **Asgari, BV; Mohsen, F; Morteza, HS; Hajian, M; Moulavi, F; Abedi, P; Laleh Hosseini, L. 2009.** Optimized Method for Bovine Blastocyst Vitrification Using a Simple Hand-Made Cryotip *Yakhteh Medical Journal*, Vol 11, No 2.
- **Al-Katanani, YM; Paula-Lopes, FF; Hansen, PJ. 2002.** Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cowsl. *J. Dairy Sci.* 85:390–396p
- **AbdelHafez; Xu, J; Goldberg, J; and Desai, N; 2011.** Vitrification in Open and Closed Carriers at Different Cell Stages: Assessment of Embryo Survival, Development, DNA Integrity and Stability during Vapor Phase Storage for Transport. Consultado Set. 2013. Disponible en:<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/11/29>
- **Ávila-Portillo; Madero, L; López, J; León, C; Acosta, M; Gómez, L; Delgado, C; 2006.** Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, vol. 57, No 4, 291-300p.
- **Banti M. 2014.** Comparison of recovery, survival and clinical pregnancy rate between two different closed vitrification devices (Rapid-i/Cryotip). Embryology Department, London Fertility Centre. Consultado Jul 2014. Disponible en:
<http://www.lfc.org.uk/sites/default/files/upload/london-fertility-centre-scientific-poster-ri-vs-cryotip-2014.pdf>
- **Bó, GA; Mapleoft, RJ. 2013.** Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, vol.10, No.3, 344-348. Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Argentina.

- **Belascoain, M; Díaz, E; Hüter, S; 2010.** Técnicas para la criopreservación de embriones Bovinos. Trabajo Final para optar al Título de Especialista en Reproducción Bovina. Universidad Nacional de Córdoba. 19p.
- **Blondin, P; Sirad MA. 1995.** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for development competence in bovine oocytes. Mol.Reprod.Dev. 41: 54-62p.
- **Celestinos, M; Gatica, R. 2002.** Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. Tesis I.R.A. Universidad Austral Chile, Valdivia, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria, vol. XXXIV, No. 2, 2002, 157-165p.
- **Condori, C. R. 2013.** Evaluación de la sobrevivencia *in vitro* de embriones vitrificados y frescos de coneja producidos *in vivo*.
- **Cutini, A; Teruel, M; Cabodevila, J. 2000.** Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Revista Taurus No 7: 28-39 y No 8: 35-47.
- **Criado, S. 2012.** The Problem of Contamination: Open vs. Closed vs. Semi-Closed Vitrification Systems. CERAM: Centre for assisted reproduction in Marbella. Spain. Consultado Jul. 2014. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/31862.pdf>
- **De Ben .1994.** Tecnología de embriones bovinos. INIA, manual N°3 Lima – Perú.
- **Dinnyes, A; Dai, Y; Jiang, S; Yang, X. 2000.** High Developmental Rates of Vitrified Bovine Oocytes Following Parthenogenetic Activation, In Vitro Fertilization, and Somatic Cell Nuclear Transfer. Biología de la Reproducción 63, 513–518p.
- **Dinnyes, A; Nedambale, TL. 2009.** Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. Reprod Fertil Dev. 2009; 21(1):45-59p.
- **Díez, C; Muñoz, M; Camaño, JN; Gómez, E; 2010.** Biotecnologías reproductivas: Producción y Criopreservación de embriones in vitro. Consultado Marz. 2015. Disponible en: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>
- **De los Reyes M; 1994.** Fecundación in vitro en bovinos: Avances en el manejo de gametos. Revista avances de ciencias veterinarias Vol. 9, No. 1.
- **De los Reyes, M; Palomino, J; Moreno, R; Parraguez, V; Barros, C. 2007.** Evaluation of cortical granules and viability evaluation during in vitro maturation of bitch oocytes subjected a long-term culture periods. Vet. Rec. 160: 196-198p.

- **De los Reyes M; Aguayo, JP; Del Campo, H; Barro, C. 1999.** Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. Avances en ciencias veterinarias Vol 14, No 1 y No2 42-54p.
- **Desai, N; Goldberg, J; Austin, C; and Falcone, T. 2013.** The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. Reproductive Biology and Endocrinology 2013, 11:41p
- **Eppig, JJ. 2001.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction 122: 829–838p.
- **Escalona, RF; y Kowalski, SA. 2008.** Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito. Criopreservación de embriones bovinos por vitrificación. Ediciones Astro Data S.A Venezuela. 739-744p.
- **Farin, PW; Crosier, AE; Farin, CE. 2001.** Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. Theriogenology 55: 151-170p.
- **Galina, C; Valencia, J. 2011.** Reproducción de animales domésticos. Tercera Edición Editorial Limusa S.A. México. 65-80p
- **Gasque, GR. 2008.** Enciclopedia Bovina. Primera edición Universidad Autónoma de México facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Consultado Marzo 2015 Disponible :<http://www.slideshare.net/sergioburgosweinberger/10-reproduccionbovina>
- **Gatica, R. 2006.** Criopreservación de embriones. Ponencia XXIX Reunion Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. 10p.
- **Gomez, E; Rodriguez, A; Muñoz, M; Camano, JN; Hidalgo, CO; Moran, E; Facal, N; Diez, C. 2008,** Serum free embryo culture médium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. Theriogenology 69:1013-1021p.
- **Gonzalez, S. 2002.** Producción in vitro de embriones. Revista E-Veterinario. Consultado Abril 2014. Disponible en: <http://canal-.net/webs/sgonzalez002/Manipulacion/PRODUCCION.htm>
- **Gonzales-Bulnes, Baird, DT; Campell, B; Cocero, M; Garcia-Garcia, R; Inskoop E; Lopez-Sebastian, A; McNelly Santiago-Moreno, J; Soza and Veiga-Lopez A. 2004.** Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. Reproduction, Fertility and Development. 16:421-435p.

- **Gordon, Ian. 1996.** Reproducción controlada del Ganado Vacuno y Búfalos. Editorial Acribia S. A. Zaragoza España. 287-299p.
- **Guignot, F. 2005** Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA Prod. Anim, 18, 27-35p.
- **Gutierrez R. 2004.** Evaluación de sobrevivencia post descongelación de blastocistos bovinos vitrificados con dos metodologías, Tesis para Licenciado en Ciencias Veterinarias .Chile. Universidad Temuco. 42p.
- **Hajarian, H; Wahid, Y; Rosnina, M; Daliri, M; Dashtizad, H; Karamishabankareh, O; Mazni, A. 2011.** Cryotop and development of vitrified immature bovine oocytes. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.63 No.1.10p.
- **Hafez, ES .2002.** Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7° Edición. Editorial M^c Graw Hill Interamericana. México Cap29: 415-435p.
- **Hasler, JF; Henderson, WB; Hurtgen, PJ; Jin, ZQ; McCauley, AD; Mower, SA; Neely, B; Shuey, LS; Stokes, JE; Trimmer. 1995.** Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 43: 141- 152p.
- **Hasler, JF. 2004.** Factors influencing the success of embryo transfer in cattle. Proceedings of the WBC Congress, Québec, Canada. Consultado Mayo 2014. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.497.2357&rep=rep1&type=pdf>
- **Hasler, JF 2011** Bovien Embryo Transfer: Are efficiencies improving? Bioniche Animal Health, Consultado Marzo 2014.Disponible en: <http://www.beefusa.org/CMDocs/BeefUSA/resources/CC2011-Beyond-BOVINE-EMBRYO-TRANSFER-EFFICIENCIES-TN-2010.pdf>
- **He, X; Park, E; Fowler, A; Yarmush, M; Toner, M. 2008.** Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. Cryobiology Vol. 56, Supl. 3, 223–232p.
- **Herradón, PG; Quintela, LA; Becerra, JJ; Ruibal, S; Fernández, M. 2007.** In vitro fertilization: An alternative for genetic improvement in bovines. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15, Supl. 1, 5p

- **Hernández-Fernández, A; Nava-Trujillo, H; Vílchez; V. 2009.** Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración *in vitro*. *Revista Producción Agropecuaria/ Sanidad Animal*, Vol. 3, N°1 41 – 44p.
- **Hoque, SA; Kabiraj, SK; Khandoker, MA; Mondai, A; Tareq, KM. 2011.** Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Journal Home* .Vol 10, No 45. Abstract.
- **Huang, JC; Lin, HH; Wu, JS; Tang, PH; Wang, DG; Liu, BT. 2006.** Vitrification of Caprine Embryos in Microdrops. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.), Vol 7 Supl. 10, 47-58p.
- **Isachenko, V; Montag, M; 2005.** Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Human Reproduction* 20, 492–496p.
- **Jiménez, C. 2009.** Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos. *Rev.Med.Vet.* 56:195-214p.
- **Kasai, M. 1996.** Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science* 42. 67-75p.
- **Kasai M, Mukaida T. 2004.** Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online*. Aug;9(2):164-170p
- **Kuwayama M, Vajta G, 2006.** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65 (2006) 236–244p
- **Kuwayama, M; Vajta, G; Kato, O; Stanley, P; Leibo. 2005.** Highly efficient vitrification for criopreservation of human oocytes and embryos: The CrioTop method. *Theriogenology*, 67: 73-80p.
- **Kuwayama, M; Vajta, G; Ieda1, Kato O. 2005.** Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *RBMOnline* - Vol 11. No 5. 2005 608-614p. *Reproductive BioMedicine Online*; www.rbmonline.com/Article/1925
- **Landa, V; Tepla, O. 1990.** Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia Biol. Praha.* 36, 153–158p.
- **Lamb, GC; Smith, GA; Perry, JA; Atkins, ME; Risley, DC; Busch, DJ; Patterson. 2009.** *Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle*. North Florida. Research and Education Center, University of Florida.15p.

- **Linder, GM; y Wright, RW. 1983.** Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20 (4): 407-416p.
- **Lonergan, P; Rizos, D; Ward, F; Boland, MP. 2001.** Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 2001 Sep-Oct;41(5):427-37p.
- **Lonergan, P; Fair, T. 2008.** In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology.* 69(1):17-22. Epub 2007 Oct 24. Abstract.
- **Martínez, YM. 2013.** Análisis de la morfología ovocitaria en Bovina previa fecundación In Vitro. Tesis de Maestría en Biología y Tecnología de la Reproducción. Universidad de Oviedo. 32p.
- **Massip, A. 2003.** Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments *Reprod. Nutr. Dev.* 43 (2003) 325–330 325p.
- **Mucci N., Aller JF., Kaiser GG., Hozbor F., Alberio RH. 2006.** Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet., Vol. XXXVIII N° 2, 2006, 97-104p.*
- **Mukaida, T; Oka, C. 2012.** Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts Best Practice. *Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 26 (2012) 789–803p.
- **Nedambale, Tshimangadzo, L; Dinnye's A; Xiangzhong Y; Tian C. 2004.** Bovine Blastocyst Development *in vitro*: Timing, Sex, and Viability Following Vitrification. *Biology of Reproduction* 71: 1671–1676p.
- **Palma, GA; Brem, G. 1993** Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en especie Bovina. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 129-142p.
- **Palma, GA. 2001.** Biotecnología de la Reproducción. Ediciones INTA S.A. México.
- **Park, YS; Kim, SS; Kim, JM; Park, HD; Byun MD. 2005.** The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* Volume 64, Issue 1 , Pages 123-134. Abstract.
- **Palasz, AT; Mapletoft, RJ. 1996.** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.* 14, 127–149p.
- **Papis, K; Shimizu, M; Izaike, Y. 1999.** The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 51, 173p.

- **Peláez, P. 2011.** Produccion *in vitro* de Embriones. Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad de Cuenca. Ecuador .74p
- **Puerta GL. 2006.** Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular (OPU) y fecundación *in vitro* (FIV) como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras cebuinas dentro del plan de modernización del hatu ganadero Colombiano. Tesis Zootecnista .Facultad Zootecnia Universidad La Salle.Colombia.60p.
- **Rall, WE; Fahy, GM. 1985.** Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°- C by vitrification. Nature 313:573-575p.
- **Redondo C. P. 2002.** Área de Zootecnia y Producción Animal. INEA. Disponible en: http://legado.inea.org/web/zootecnia/Zootecnia/Hormonas_hembra.htm
- **Rheingantz TM. 2007.** Esquema de la PIV. Instituto de Biologia-Universidad Federal Pelotas. Disponible en: http://minerva.ufpel.edu.br/~mgrheing/quem_somos.htm
- **Rodríguez VP. y Bó GA. 2011.** Criopreservación de embriones Bovinos. SPERMOVA (2011) 1(1): 44-49p.
- **Ruvalcaba, CA; García, AM; Chávez, BA; Medina, FJ; Montoya, SJ; Quiroz, TE; Martínez, AR. 2009.** Vitrification in cryotop is a higher efficient technique for the criopreservation of human oocytes. Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción 2009; V1.Supl.3:96-101p.
- **Rippe C. 2009.** El ciclo Estral. Dairy Cattle Reproduction Conference Minneapolis, MN Boise, ID . 110-116p.
- **Rizos, A; Gutierrez, A; Perez, S; De la Fuente, J; Boland, MP; Lonergan P. 2003.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol Reprod. 2003; 68:236-243p.
- **Rizos, D; Clemente, M; Bermejo-Alvarez, P; De la Fuente, J; Lonergan, P; Gutierrezadan A. 2008.** Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. Reprod Dom Anim; Vol.43. Supl.4: 44-50p.
- **Seidel, G; Jason, K; Jason E; Bruemmer. 2012.** Vitrification of *in vitro* and *in vivo* produced bovine embryos for direct transfer. Tesis: Mag.Sc.. Department of Biomedical Sciences Colorado State University. 82p.

- **Serrano, C; Sierra, R; Sanchez, J; Restrepo, L; Olivera, M. 2002.** Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la Calidad de embriones producidos in vitro. Rev. Col. Cienc. Pec. vol. 15: 3, pp. 286-292p.
- **Sintex, 2005.** Fisiología Reproductiva del Bovino. Laboratorio de Especialidades Veterinarias. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar
- **Tominaga, K. 2004.** Cryopreservation and sexing of in vivo and in vitro produced Bovine Embryos for their Practical Use. Journal of Reproduction and Development, vol 50, No. 1.
- **Vajta, G; Nagy, ZP. 2006.** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. Reproductive BioMedicine Online, 12, 779- 796.
- **Vajta G. 2000.** Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Animal Reproduction Science 60–61: 357–364
- **Valbuena, D; Póo, ME; Aguilar-Gallardo, C; Martínez, S; Cobo, AC; Pellicer, A; Simón, C. 2012.** Comparison of Cryotip vs. Cryotop for mouse and human blastomere vitrification. Fertil Steril. Jan; 97(1):209-17.
- **Van Soom, A; Mateusen, B; Leroy, J; De Kruif A. 2003.** Assessment of mammalian embryo quality : what can we learn from embryo morphology?. Reproductive Bio Medicine Online Vol.7 .Supl. 6: 664-670p
- **Xu, Z; Guo, L; Su, TL; Nedambale, J; Zhang, J; Schenk, JF; Dinnye's, M; Ji, XC; Tian, X; Yang. 2006.** Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm. J. Dairy Sci. 89:2510–2518. American Dairy Science Association. 29-38p
- **Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS), 2010.** Irvine Scientific, CA, USA) Disponible en: www.irvinesci.com

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Cuadro de resultados de tasa de recuperación de embriones vitrificados en dispositivo Vitri-tip y Vitri-top.

Dispositivo Vitri-top	Embriones Vitrificados	Tasa de recuperación post descongelación
R1	9	9
R2	19	16
R3	12	11
R4	10	8
	50	44
	%	88.0

Dispositivo Vitri-tip	Embriones vitrificados	Tasa de recuperación post descongelación
R1	14	14
R2	13	12
R3	10	9
R4	13	11
	50	46
	%	92.0

Cuadro resultados

Dispositivo de vitrificación	Embriones en estado blastocisto	Tasa de recuperación, (%)
Vitri-tip	50	46 (92 %)a
Vitri-top	50	44 (88 %)a

Cálculo de X^2 de la tasa de recuperación post descongelación, con un índice de significancia de $p < 0.05$, y se asumió la siguiente hipótesis.

Ha: $T1 \neq T2$

Ho: $T1 = T2$

T1: Blastocistos recuperados postdescongelación con el uso del dispositivo vitri-tip.

T2: Blastocistos recuperados postdescongelación con el uso del dispositivo vitri-top.

Formula: $\sum [(O_i - E_i)]^2$

$$X^2 = \frac{\sum [(O_i - E_i)]^2}{E_i} \sim X^2_{(k-1, \alpha)}$$

Donde:

O_i: Frecuencia observada en la vitrificación con dispositivo vitri-tip.

E_i: Frecuencia esperada en la vitrificación con dispositivo vitri-top.

k: Numero de tratamientos

Calculo χ^2

Tratamientos	Vitri-top	Vitri-tip	Total
Nº \bar{e} cultivados	50	50	100
Nº \bar{e} re-expandidos	44	46	90

$$\alpha=0.05 \quad 45*44/90 = 22$$

$$45*46/90 = 23$$

Tratamientos	Vitri-top	Vitri-tip	Total
Nº \bar{e} observados	44	46	100
Nº \bar{e} esperados	45	45	90

$$\chi^2 \text{ cal} = (44-45)^2/45 + (46-45)^2/45 = 0.022+0.022=0.044$$

$$\chi^2 \text{ tab (0.05) con 1 gl} = 3.841$$

$$\chi^2 \text{ cal} \leq \chi^2 \text{ tab}$$

Conclusión estadística

No podemos rechazar la hipótesis nula con un 5% de probabilidad de hacer un rechazo indebido, por lo tanto concluimos que no hay diferencias en el uso de los dispositivos Vitri-tip y Vitri-top, al momento de evaluar la tasa de recuperación durante el descongelamiento de blastocistos vitrificados.

Anexo 2: Resultados de la tasa de re-expansión postdescongelamiento de blastocistos bovinos vitrificados a 3 horas por cultivo *in vitro*.

Dispositivo Vitri-top	Embriones cultivados <i>in vitro</i>	Tasa de re-expansión a 3 horas
R1	9	7
R2	16	6
R3	11	4
R4	8	4
	44	21
	%	48.0

Dispositivo Vitri-tip	Embriones cultivados <i>in vitro</i>	Tasa de re-expansión a 3 horas
R1	14	8
R2	12	6
R3	9	4
R4	11	6
	46	24
	%	52.0

Cuadro Resultados

Dispositivo de vitrificación	Blastocistos cultivados <i>in vitro</i>	Re-expandidos en cultivo <i>in vitro</i> a 3h, n (%)
Vitri-tip	46	24 (52 %)
Vitri-top	44	21 (48 %)

Cálculo de X^2 de la tasa de re-expansión a 3 h, con un índice de significancia de $p < 0.05$, y se asumió la siguiente hipótesis y se aplicará la fórmula de X^2 .

Ha: $T1 \neq T2$

Ho: $T1 = T2$

T1: Blastocistos re-expandidos a 3h postdescongelación con el uso del dispositivo vitri-tip.

T2: Blastocistos re-expandidos a 3h postdescongelación con el uso del dispositivo vitri-top.

Donde:

O_i: Frecuencia observada en la vitrificación con dispositivo vitri-tip.

E_i: Frecuencia esperada en la vitrificación con dispositivo vitri-top.

k: Numero de tratamientos

Calculo χ^2

Tratamientos	Vitri-top	Vitri-tip	Total
N° \bar{e} cultivados	44	46	90
N° \bar{e} re-expandidos	21	24	45

$$\alpha=0.05 \quad 45*44/90 = 22$$
$$45*46/90 = 23$$

Tratamientos	Vitri-top	Vitri-tip	Total
N° \bar{e} observados	21	24	45
N° \bar{e} esperados	22	23	45

$$\chi^2 \text{ cal} = (21-22)^2/22 + (24-23)^2/23 = 0.045 + 0.043 = 0.088$$

$$\chi^2 \text{ tab} (0.05) \text{ con } 1 \text{ gl} = 3.841$$

$$\chi^2 \text{ cal} \leq \chi^2 \text{ tab}$$

Conclusión estadística

No podemos rechazar la hipótesis nula con un 5% de probabilidad de hacer un rechazo indebido, por lo tanto concluimos que no hay diferencias en el uso de los dispositivos Vitri-tip y Vitri-top, al momento de evaluar la tasa de re-expansión a las 3h de cultivo *in vitro* de blastocistos vitrificados.