

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“SOBREVIVENCIA DE BLASTOCISTOS BOVINOS *in vitro* EN DOS
MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN”**

Presentada por:

KATHERINE PATRICIA ORIUNDO NÚÑEZ

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Lima – Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“SOBREVIVENCIA DE BLASTOCISTOS BOVINOS *in vitro* EN DOS
MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

KATHERINE PATRICIA ORIUNDO NÚÑEZ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Juan Chávez Cossio

PRESIDENTE

Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva

PATROCINADOR

Ph.D. Javier Ñaupari Vásquez

MIEMBRO

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca

MIEMBRO

DEDICATORIA

Con especial cariño a mis padres y hermano, mi tesoro de valor incalculable, quienes me dieron una base sólida, el ejemplo de luchar e incentivado en culminar con mis estudios profesionales.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria la Molina, por albergarme en sus aulas.

Al Mg. Sc. Próspero Cabrera Villanueva, por el seguimiento continuo del trabajo, sus aportes, consejos y por su acertada labor de asesor, los cuales han sido fundamentales para culminación de la tesis.

Al Mg. Sc. Edwin Mellisho Salas, jefe del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la UNALM que hizo posible la realización del trabajo de investigación, por los consejos y enseñanzas brindadas.

A los docentes de la Maestría de Producción Animal, quienes durante mis años de permanencia en la UNALM, me brindaron sus conocimientos y experiencias.

A todos mis amigos por los consejos, apoyo, ánimo, que fueron vitales para la culminación de la tesis

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1.	PANORAMA DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES	4
2.2.	PRODUCCION DE EMBRIONES <i>IN VIVO E IN VITRO</i>	5
2.2.1.	Obtención de los complejo cumulus oofurus (COC's).....	5
2.2.2.	Clasificación de los ovocitos	6
2.2.3.	Maduración de ovocitos	7
2.2.4.	La fertilización <i>in vitro</i> – FIV	8
2.2.5.	Selección y capacitación espermática	9
2.2.6.	Análisis seminal	10
2.2.7.	Cultivo de ovocitos.....	11
2.2.8.	Constituyentes de los medios de cultivo	12
2.2.9.	Requerimientos fisiológicos	14
2.2.10.	Efectos del cultivo <i>in vitro</i> sobre la calidad del embrión	15
2.2.11.	Suero fetal bovino (FBS) en el cultivo <i>in vitro</i> de embriones.....	15
2.3.	DESARROLLO EMBRIONARIO	16
2.3.1.	Etapas del desarrollo del embrión	16
2.3.2.	Evaluación de calidad.....	17
2.3.3.	Diferencias entre los embriones producidos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	18
2.4.	CRIOBIOLOGÍA	18
2.4.1.	Criopreservación	19
2.4.2.	Características de los embriones producidos <i>in vitro</i> relacionados a baja congelabilidad.....	20
2.4.3.	Tasa de enfriamiento	21
2.4.4.	Crioprotectores	21
2.5.	MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN	22
2.6.	FACTORES QUE DETERMINAN LA TOLERANCIA A LA CRIOPRESERVACIÓN	26
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1.	LUGAR DE ESTUDIO.....	28
3.2.	MATERIAL BIOLÓGICO	28

3.3. EQUIPOS DE LABORATORIO	29
3.4. MATERIALES	29
3.5. MÉTODO EXPERIMENTAL	30
3.5.1. PRODUCCIÓN DE BLASTOCISTOS <i>IN VITRO</i>	30
3.5.2. CRIOPRESERVACIÓN DE BLASTOCISTOS.....	37
3.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
3.6. VARIABLES EVALUADAS	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1. Tasa de división y Producción de blastocistos	44
4.2. Tasa de recuperación de blastocistos	46
4.3. Tasa de re expansión de los blastocistos	48
V. CONCLUSIONES	53
VI. RECOMENDACIONES	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
VIII. ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Eficiencia de la producción de blastocistos bovinos in vitro.....	44
Tabla N° 2: Tasa de recuperación de blastocistos bovinos in vitro.....	58
Tabla N° 3 : Tasa de re expansión post criopreservación de blastocistos bovinos in vitro..	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Clasificación de los ovocitos	6
Figura N° 2: Mórulas compactas).....	17
Figura N° 3: Proceso de producción de blastocitos in vitro	30
Figura N° 4: Manejo de ovarios y obtención de ovocitos.	32
Figura N° 5: Maduración de ovocitos	33
Figura N° 6 Fertilización in vitro.	35
Figura N° 7: Cultivo de embriones.....	36
Figura N° 8 : Proceso de congelación lenta de blastocitos.....	38
Figura N° 9: Congelación tradiciona.	39
Figura N° 10: Proceso de vitrificación de blastocitos	40
Figura N° 11: Vitrificación.....	41
Figura N° 12: Proceso de desvitrificación de blastocitos.....	53
Figura N° 13: Re expansión de blastocistos bovinos	48

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar, entre los métodos de criopreservación de congelación convencional y vitrificación, el que asegure una mayor tasa de sobrevivencia de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, evaluando: 1) porcentaje de recuperación de blastocistos post descongelación, 2) porcentaje de re- expansión de blastocistos descongelados. Para la producción de blastocistos, los ovocitos fueron madurados , fertilizadas y cultivadas *in vitro* a 38 °C con 5% CO₂; los blastocistos obtenidos se asignaron aleatoriamente a los métodos de criopreservación . La tasa de recuperación de embriones post criopreservación fue de 92.31 % por el método de congelación convencional, y 77.55 % por vitrificación, siendo esta diferencia significativa entre los métodos ($p < 0,05$); estas diferencias posiblemente se deban a la facilidad de manejo de los dispositivos. Para la evaluación de la tasa de re expansión los embriones criopreservados fueron cultivados en IVC, en una atmósfera compuesta por 5 % de CO₂, 90% humedad a 38 °C, durante 3 horas. Reexpandieron un 43.75 % de embriones congelados y un 26.32 % de embriones vitrificados, siendo esta diferencia no significativa ($p < 0.05$). Se determinó que ambos métodos de criopreservación disminuyeron la calidad embrionaria post descongelación.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine, among conventional freezing and vitrification cryopreservation methods, the one that ensures a higher survival rate of bovine blastocysts produced in vitro, evaluating: 1) recovery percentage of blastocysts post thawing, 2) percentage of re-expansion of thawed blastocysts. For the production of blastocysts, the oocytes were matured, fertilized and cultured in vitro at 38 ° C with 5% CO₂; the obtained blastocysts were randomly assigned to cryopreservation methods. The rate of recovery of embryos after cryopreservation was 92.31% by the conventional freezing method, and 77.55% by vitrification, this difference being significant among the methods ($p < 0.05$); These differences are possibly due to the ease of handling of the devices. For the evaluation of the re-expansion rate, cryopreserved embryos were cultured in IVC, in an atmosphere composed of 5% CO₂, 90% humidity at 38 ° C, for 3 hours. They reexpanded 43.75% of frozen embryos and 26.32% of vitrified embryos, this difference being not significant ($p < 0.05$). It was determined that both cryopreservation methods decreased embryo quality after thawing.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los países de Sudamérica en los que se produce y consume menor cantidad de leche, con un consumo per cápita de tan solo 60 lt/hab/año, cifra que resulta preocupante puesto que es solo el 50 por ciento de los 120 litros/hab/año recomendado por Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). La producción deficiente se puede atribuir a la baja productividad del ganado criollo y sus cruces, que representa el 64% de la población total de vacunos del país; en tanto, la raza Brown Swiss equivale al 17,6%; la Holstein, al 10,3%; Gyr/Cebú, 3,4%; y otras razas, 4,8% (INEI, 2013).

Al ser nuestro país deficiente en producción láctea se deben de implementar planes de mejora en pastos, sanidad y genética, esta última indispensable para incrementar el número de animales del más alto valor productivo y reproductivo, especializados en la producción láctea o a través de la importación de vientres, la cual es difícil por los permisos sanitarios complejos del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) del Perú, que requiere dicha importación, además de ser costosa. Otra alternativa es utilizar herramientas biotecnológicas como la transferencia de embriones de alto valor genético, producidos *in vivo* o *in vitro*, que en corto plazo pueden generar un significativo impacto en la productividad lechera nacional.

Actualmente la técnica de transferencia de embriones se desarrolla utilizando embriones frescos, es decir inmediata a la colecta, o al día 7 de la fertilización *in vitro*, optimizando la selección y multiplicación de animales de alto valor genético. Una herramienta complementaria e indispensable, que permitirá consolidar el impacto de esta biotecnología, es la criopreservación de embriones a temperaturas bajas (-196 °C, en nitrógeno líquido). Procedimiento desarrollado por el interés en la conservación de embriones de animales con valiosa información genética y especies en riesgo de extinción. La criopreservación de embriones se ha convertido en parte esencial de la reproducción asistida de las principales especies domésticas (Leibo y Loskutof, 1993).

El desarrollo de la criopreservación de embriones bovinos *in vitro* ha proporcionado una serie de ventajas como reducir los costos de mantenimiento de receptoras y obtener gestaciones con receptoras trabajadas con celo natural; formación de bancos de germoplasma, permitiendo el uso eficiente de los embriones, ya que éstos se pueden almacenar por largos periodos, lo que es importante para implementar estrategias de cruzamiento. Tener embriones congelados, simplificará el movimiento del material genético para intercambios nacionales, e incluso internacionales, a un bajo costo -frente a los animales adquiridos en pie-, mayor seguridad zoonosanitaria, utilización de receptoras adaptadas a diversas altitudes en cualquier época y región (Serrano *et al.*, 2002).

Sin embargo, la criopreservación de embriones tiene dos desventajas: a) requiere de equipos muy sofisticados y costosos (>10,000 USD); y, b) la viabilidad de los embriones se reduce entre 20 a 40%, en especial los producidos *in vitro*, ya que estos difieren de sus homólogos *in vivo* en algunos aspectos (morfología, velocidad de desarrollo y metabolismo); debido a estas diferencias, los embriones producidos *in vitro* son más sensibles a los efectos derivados de la congelación (Gómez *et al.*, 2009); por esta razón, los estudios en criobiología permanecen en constante evolución, buscando alternativas para mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados (Fahning y García, 1992).

Actualmente se utilizan dos métodos de criopreservación: la congelación lenta y vitrificación. Ambos producen diferentes lesiones en los blastocistos, presentando la congelación lenta un mayor riesgo por la formación de hielo intracelular. Por otro lado, la vitrificación, consiste en la solidificación de una solución por la mayor viscosidad durante el enfriamiento, sin llegar a formar cristales de hielo perjudiciales (Vajta, 2000). Sin embargo, en nuestro país el desarrollo de la tecnología de criopreservación de embriones es aún reducido, debido a la poca información sobre la misma, desconociéndose sus beneficios y oportunidades. En el presente trabajo de investigación se comparan dos métodos de criopreservación, importante para complementar la biotecnología de la producción de embriones *in vitro*, siendo los objetivos planteados, los que se indican a continuación.

Objetivo general:

- Determinar, entre los métodos de criopreservación de congelación convencional y vitrificación, el que asegure una mayor tasa de sobrevivencia de blastocistos bovinos producidos *in vitro*.

Objetivos específicos:

- Determinar el porcentaje de recuperación de blastocistos post descongelación; y,
- Determinar el porcentaje y re-expansión de blastocistos descongelados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. PANORAMA DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES

Las biotecnologías reproductivas se constituyen en uno de los mejores ejemplos en lo que se refiere al éxito de la transferencia tecnológica. La inseminación artificial fue la primera generación de tecnología reproductiva asistida, y que actualmente se utiliza en todo el mundo. Al presente se manejan diversas biotecnologías, como la transferencia de embriones, fertilización *in vitro* (FIV), sexado de embriones, y la transferencia nuclear (Thibier, 2005). La producción de embriones *in vitro* está empezando a tener un alto valor tecnológico y comercial, debido a la facilidad de manejo del material genético en pequeñas pajillas, viabilidad prolongada bajo criopreservación. (Wrathall, 1995).

Las diferentes biotecnologías reproductivas han permitido una mayor contribución genética de la hembra, ya que el número crías por hembra, a lo largo de su vida reproductiva, aumentó significativamente con las técnicas de transferencia y producción *in vitro* de embriones (Gonçalves *et al.*, 2007). Según la Sociedad Embrión Internacional de Transferencia (IETS), Brasil es el mayor productor de embriones de la especie bovina en el mundo, cubriendo casi un tercio de la producción mundial (SBTE, 2009). En el Perú la producción *in vitro* de embriones se viene desarrollando gracias a Láctea S.A y su Laboratorio de Embriones Sembryo, implementado en Virú, La Libertad, es así que para el 2016 Sembryo tiene 500 crías nacidas por transferencia de embriones y fertilización *in vitro*, animales que son comercializados a diferentes regiones del Perú: Ayacucho, Piura, Lambayeque, Cajamarca, Cutervo, Leymebamba y Huánuco.

La metodología de la producción de embriones *in vitro*, incluye la maduración de ovocitos recuperados de folículos pequeños (3 - 8 mm), fertilización y cultivo de los mismos por siete días, obteniéndose 30 a 40 por ciento de blastocistos, de los cuales sólo el 40 por ciento se implantan después de la transferencia (Mohan *et al.*, 2002).

2.2. PRODUCCION DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO*

La producción *in vivo* de embriones o transferencia de embriones, consiste en la aplicación de un tratamiento hormonal a una vaca donadora para inducir la ovulación múltiple, inseminar y la colección de embriones. La ovulación múltiple se produce por el estímulo hormonal del ovario para aumentar el número de folículos producidos durante el estro, por medio de la aplicación de diferentes tipos de hormonas, entre las cuales se destacan la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina del Suero de Yeguas Preñadas (PMSG). La Transferencia de Embriones (TE), consiste en extraer embriones aun no implantados, del conducto reproductor de la hembra donante, por perfusión con un medio apropiado, para luego depositarlos en el conducto de una hembra receptora de la misma especie, donde se obtiene la gestación a término (Mosquera 1994).

El fenómeno o proceso a través del cual el espermatozoide es capaz de unirse y penetrar al óvulo para formar un nuevo individuo bajo condiciones de laboratorio (fuera del organismo animal) se conoce como fecundación *in vitro* o producción *in vitro*, que es un sistema alternativo de producción de embriones, que utiliza ovocitos inmaduros recogidos de ovarios de donantes de varias edades y etapas fisiológicas. (Gonçalves, 2002). La producción de embriones *in vitro* comienza en la obtención de ovocitos, que pueden ser adquiridos por la aspiración folicular transvaginal de donantes o por la recolección de ovarios en mataderos, los siguientes procesos son la maduración, fertilización de ovocitos y cultivo de cigotos y embriones. (Baggio, 2008)

Este último método presenta algunas desventajas en relación a la transferencia de embriones como: el costo es muy alto comparado con el de TE, la eficiencia es relativamente baja (Hasler 1998). El cultivo *in vitro* de embriones puede provocar una reducción en las tasas de gestación y mayores tasas de muerte perinatal (Gordon, 2006).

2.2.1. Obtención de los complejo cumulus oofurus (COC's)

La recuperación de ovocitos permite usar folículos pre ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas normales se tornarían en atrésicos, lo cual es de mucha importancia para lograr el máximo aprovechamiento del potencial genético de una donadora mediante procedimientos *in vitro* (Gordon y Lu, 1990).

Los ovocitos se pueden obtener post mortem por medio de la aspiración de los folículos con una aguja y/o bomba de succión, a un costo reducido que cuando se emplean aparatos electrónicos. Sin embargo, no se conoce si los folículos recuperados, están en fase de crecimiento o regresión, lo que afectaría la calidad de los ovocitos logrados (Palma, 2001).

Otra manera de obtener ovocitos es a través de procesos de aspiración folicular *in vivo* (OPU –Ovum pick up), permitiendo su obtención de hembras mayores de 6 meses, preñadas, o después del parto, vacas adultas en varios estados fisiológicos es: cíclicas, no cíclicas, las que no responden a estímulos hormonales, también en animales viejos con desordenes reproductivos (Galli *et al.*, 2001). El OPU produce mayor porcentaje de embriones, y mayor número de embriones transferibles de aspiraciones realizadas semanalmente (Gibbons *et al.*, 1994).

2.2.2. Clasificación de los ovocitos

Los complejos cumulus-ovocito (COC) recogidos son clasificados en cuatro categorías, de acuerdo a las características basadas en su grado de compactación, presencia o ausencia de la capa de células del cumulus que lo rodean, la homogeneidad y la transparencia del ooplasma, utilizando el sistema de clasificación descrita por Leibfried y First (1979). Se consideran viables los de clasificación I y II, los III y IV son descartados. (Figura N° 1)

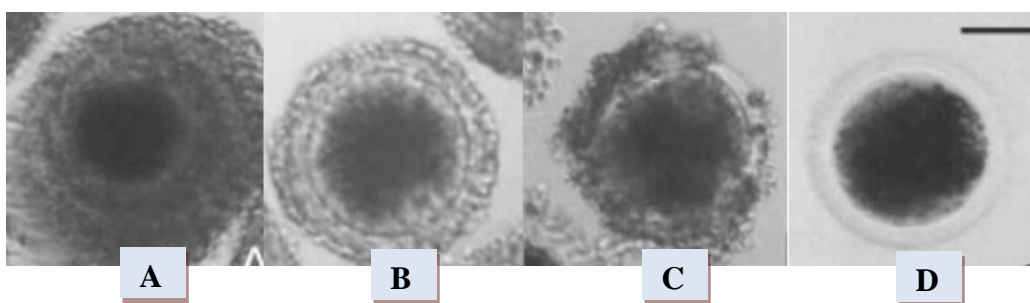


Figura N° 1: Clasificación de los ovocitos: a) ovocito grado I, b) ovocito grado II, c) ovocito grado III, d) ovocito grado IV.

Grado I: Presentan más de tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie. Presentan ooplasma granulado y homogéneo y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Grado II: Se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células del cúmulus. Presentan ovoplasma granuloso no homogéneo, (periferia clara y centro oscuro) y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida

Grado III: Se encuentran rodeados por células del cúmulus expandidas. Presentan ovoplasma vacuolado, fragmentado y que no llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida

Grado IV: Ovocitos desprovistos de células del cúmulo con granulación citoplasmática y color anormal o células expandidas con aparición de apoptosis

2.2.3. Maduración de ovocitos

Durante la vida fetal, los ovocitos de los mamíferos comienzan con el proceso de meiosis hasta llegar a la etapa de la profase I, para luego entrar en una fase estacionaria y reanudar la maduración durante la pubertad en respuesta a los estímulos de las gonadotropinas, es así que la maduración *in vivo* depende de la estimulación hormonal preovulatoria del folículo por hormonas como las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (Pieterse *et al.*, 1988). Después del pico de LH preovulatoria ocurre la reanudación de la secuencia de eventos que culminan en la maduración nuclear. En paralelo, y de forma independiente, el ovocito debe pasar a través de una maduración citoplasmática, necesaria para asegurar su fertilización y desarrollo posterior en embrión (Thibier, 2004). Al ser sometidos a la maduración, los ovocitos, reanudan la meiosis y aproximadamente el 90 por ciento de ellos alcanzan la etapa de metafase II y expulsan el primer cuerpo polar, entre las 16 y 24 horas de comenzada la maduración (Ahuja *et al.*, 2009).

En el procedimiento *in vitro*, existe el fenómeno conocido como maduración meiótica espontánea, lo que lleva a la maduración nuclear independiente de estímulo gonadotropina. Básicamente, el medio más utilizado para la maduración es el TCM-199 tamponado con bicarbonato y suplementado con suero fetal bovino (FBS), antibióticos, piruvato y hormonas; además de contener algunos factores de crecimiento, tales como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) o el Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-1) utilizados para disminuir la apoptosis, promoviendo la mejora de la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* (Sirard *et al.*, 2006). Varios compuestos con efectos antioxidantes se han utilizado con el fin de disminuir la formación de radicales libres que causan graves daños a

los embriones cultivados *in vitro*. Van Soom *et al.* (2002) demostraron que la suplementación del medio de maduración *in vitro* (IVM) con cisteamina mejora el desarrollo y la calidad del embrión.

Actualmente, la maduración *in vitro* presenta altos niveles de eficiencia, siendo posible obtener el 80-90 por ciento de los ovocitos madurados y en condiciones de proseguir a su fecundación y comenzar a dividirse, al menos hasta el estadio de 2 a 4 células (Sirard *et al.*, 2006). Sin embargo, sólo un 25-40 por ciento alcanza el estadio de blastocisto o blastocisto expandido, luego de su cultivo durante 6-7 días (Mucci *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de que los ovocitos madurados *in vitro* muestran tasas de maduración nuclear, fecundación y división embrionaria similares a los madurados *in vivo*, su capacidad de desarrollo es significativamente inferior. Mientras que el 85% de los ovocitos madurados *in vivo* son capaces de dar origen a un embrión, solo un tercio de los ovocitos madurados *in vitro* obtienen esa capacidad. Esta diferencia se debería fundamentalmente al origen de los ovocitos (Blondin *et al.*, 2002). El origen de los ovocitos madurados *in vitro* es muy heterogéneo ya que se obtienen de folículos subordinados o en crecimiento, que no llegan a completar su maduración o capacitación, lo que si ocurre *in vivo* en los folículos dominantes y mediante lo cual alcanzarán la capacidad de desarrollo completo (Hyttel *et al.*, 1997).

La fertilización *in vitro* – FIV

El espermatozoide bovino es una célula altamente especializada, con capacidad de fertilizar al ovocito, sin embargo previo al evento de fecundación, este debe someterse a una serie de cambios bioquímicos para lograr el llamado estado de empoderamiento (Bousquet *et al.*, 1999). Varias proteínas producidas por las vesículas seminales se unen a la superficie del espermatozoide en la eyaculación *in vivo*; estas proteínas son eliminadas en el momento en que el esperma entra en contacto con el líquido existente en los cuernos uterinos. Después de la eliminación de estas proteínas, el espermatozoide está listo para fecundar (Gordon, 2003)

La fertilización resume dos eventos iniciados por la penetración del espermatozoide a través de las diferentes capas celulares y no celulares que rodean al ovocito y culminan con la formación de ambos pronúcleos. La fecundación *in vitro*, es el procedimiento por el cual los ovocitos maduros son cultivados junto con los espermatozoides y así fecundados (Palma, 2001).

2.2.4. Selección y capacitación espermática

En condiciones naturales el tracto reproductivo de la hembra puede ser considerado como un órgano con doble acción selectiva, primero al permitir la separación de espermatozoides del plasma seminal y subsecuentemente en proveer barreras para evitar el paso de espermatozoides anormales (Taylor, 2008).

Varios mecanismos se han sugerido para imitar la selección de espermatozoides de buena calidad en el tracto reproductor femenino y así ajustarse a la definición de la biomimética (uso de tecnologías y/o procesos que imitan a un evento de origen natural). Estos mecanismos, activa o pasivamente, filtran espermatozoides del plasma seminal, imitando así el efecto de su migración lejos del sitio de deposición del semen, o permitiendo la elección de la mejor calidad de los espermatozoides del resto del eyaculado, como puede ocurrir en la unión útero-tubárica y en los oviductos *in vivo* (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009).

Existen varios métodos para la selección de espermatozoides y la selección de uno de estos depende no sólo de asegurar su motilidad, sino también de la complejidad de la técnica, el material, equipo requerido, el tiempo y los costos (Mortimer *et al.*, 1997).

La selección de espermatozoides no sólo es necesaria para remover el plasma seminal y crioprotectores, sino que también es utilizada para obtener una fracción de espermatozoides con un mínimo de 70 por ciento de movilidad rectilínea progresiva de una muestra de semen (Urrego *et al.*, 2008).

Se demostró con éxito que los programas de producción de embriones *in vitro* están estrechamente relacionados con el uso de toros previamente seleccionados con alta fertilidad (Xu *et al.*, 2006). La capacitación de los espermatozoides implica varias reacciones bioquímicas y cambios en la membrana plasmática; entre los cambios, se resalta el aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática para facilitar la reacción del acrosoma y liberación de enzimas acrosomales que promueven la digestión de la zona pelúcida. Para que este cambio ocurra *in vitro* se añaden agentes condensadores como la heparina y el calcio ionóforo (Assumpção *et al.*, 2002).

2.2.5. Análisis seminal

El semen es uno de los fluidos biológicos más variables que existe (Lewis *et al.*, 1997), ya que los espermatozoides son capaces de cambiar su comportamiento en respuesta a pequeños cambios ambientales, como métodos de procesamiento, conservación, temperatura, entre otros; por ello, la reproducción animal se enfrenta a un gran reto a la hora de valorar la calidad seminal y comparar sus resultados con los de otros estudios, debido en parte a la ausencia de un protocolo estándar de valoración (Gravance *et al.*, 1998). Así, se propone que el mejor indicativo para evaluar la capacidad fecundante de una muestra de semen es la tasa de división embrionaria (clivaje), mientras que la tasa de blastocisto (desarrollo embrionario temprano) depende de múltiples factores y, en gran medida, de las condiciones de cultivo (Rodríguez *et al.*, 2008).

El análisis de semen ideal, sería aquél que de forma sencilla y eficaz permitiera predecir su capacidad fecundante. Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, integridad estructural, funcionalidad de la membrana, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. Sin embargo, este análisis integral es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática (Amann, 1989).

La evaluación de la motilidad, concentración y anomalías morfológicas, se consideran como esenciales para detectar la posibilidad de penetración a las células del cúmulo; sin embargo, no pueden considerarse indicadores reales de la capacidad fecundante de los espermatozoides, por tratarse de pruebas subjetivas, y por lo tanto sujetas a variaciones de acuerdo con el técnico que la realiza y sus capacidades (Machado, 2009).

Actualmente, el análisis seminal clásico ha mejorado con la introducción de nuevas técnicas analíticas procedentes de otros campos de la investigación científica. Así, el estudio de la motilidad, concentración, que anteriormente se hacían de manera subjetiva, pueden realizarse por métodos de análisis computarizados (informáticos), los cuales atenúan, en gran parte, el factor subjetivo del análisis seminal clásico y garantiza una mejor correlación con la real capacidad fecundante del espermatozoide (Graham, y Mocé, 2005).

a. Sistema computarizado de análisis de semen

El sistema de análisis seminal de manera objetiva fue introducida al mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas C.A.S.A (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando; en consecuencia, comenzaron a utilizarse cada vez con más frecuencia en veterinaria, con énfasis en la especie bovina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria y los centros de inseminación artificial (Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen *et al.*, 2002).

Un sistema C.A.S.A consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo. (Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen *et al.*, 2002).

Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los sistemas C.A.S.A. Uno de los parámetros más utilizado es el porcentaje de motilidad total o de motilidad progresiva: en función de su velocidad curvilínea (VCL) o de su velocidad media (VAP), los espermatozoides son clasificados en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos; y dentro de los móviles, en rápidos, medios y lentos. Al final del proceso, el C.A.S.A proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar *et al.*, 1991).

2.2.6. Cultivo de ovocitos

Los primeros medios permitían el desarrollo de los embriones bovinos hasta la etapa de 8 células. En un intento de superar este bloqueo, hubo un aumento significativo en la implementación del sistema de co-cultivo con células somáticas, responsables de secretar

factores embriotróficos *in vitro* indispensables para simular el ambiente uterino (Thompson *et al.*, 2000).

Varios estudios muestran que diferentes tipos de células se pueden usar en el co-cultivo, como células uterinas, de la granulosa, del oviducto, cúmulos, entre otros (Hasler, 2000). Una alternativa a los sistemas de co-cultivo es el uso de fuentes de proteínas, ya que estos aumentan la cantidad y la calidad de las estructuras del embrión para llegar a la etapa de blastocisto (Rorie *et al.*, 1994). Suplementación que parece reducir la embriotoxicidad causada por productos del metabolismo del embrión. Entre las fuentes de proteínas utilizadas, en la mayoría de los sistemas de cultivo *in vitro*, se tienen el suero fetal bovino (FBS) y albúmina de suero bovino (BSA); el suero se presenta como una mezcla compleja de sustancias y factores de crecimiento, que desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario (Holm *et al.*, 1999).

Los medios cercanos a las condiciones fisiológicas tienen en cuenta las necesidades nutricionales de acuerdo a las diferentes etapas de desarrollo embrión, ya que este cambia sus exigencias nutricionales de acuerdo con su etapa de desarrollo. Niveles altos de glucosa y aminoácidos son beneficiosos para mórulas y blastocistos, y muy perjudiciales para la fase previa entre las dos y ocho células; condiciones que deben tomarse en cuenta para generar una adecuada tasa de desarrollo fetal (Gardner, 1996).

2.2.7. Constituyentes de los medios de cultivo

a. Agua

Mayor componente de los medios de cultivo (>98 por ciento), su calidad tiene un profundo efecto sobre el desarrollo de los embriones *in vitro*. El restante 1-2% son iones inorgánicos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, antioxidantes, hormonas y factores de crecimiento, cuya pureza química es muy importante; no obstante, aún cuando los medios de cultivo cuenten con agua de óptima calidad, son muy dependientes de los cambios de temperatura, pH, osmolaridad, concentración del gas, y la cantidad de embriones contenidos en un determinado volumen de medio de cultivo (Whittingham, 1971).

b. Iones inorgánicos

Las funciones de los iones inorgánicos son catalíticas y fisiológicas. La composición iónica de la mayoría de los medios de cultivo se basa en el análisis bioquímico del líquido oviductal (Tervit *et al.*, 1972). La composición es generalmente de cloruro de sodio, necesario para regular la osmolaridad del medio, calcio y potasio, esenciales para el desarrollo embrionario. La ausencia de calcio en el medio de cultivo resulta en una reducción de las divisiones embrionarias y en una incapacidad para la compactación de las mórulas (Kim *et al.*, 1993).

c. Substratos energéticos

Las fuentes de energía más comunes en el medio de cultivo son el lactato, el piruvato y la glucosa. Todos estos substratos se han encontrado en el líquido oviductal, sus funciones difieren en los medios de cultivo de las diferentes especies animales y estadios de desarrollo embrionario. En los estadios más tempranos (embriones de 1-2 células) se utiliza el piruvato y/o el lactato pero no la glucosa (Gutiérrez *et al.*, 2001). Otras fuentes de energía, además de la glucosa, son utilizadas a partir del estadio de 8 células (Rieger *et al.*, 1992).

d. Aminoácidos y vitaminas

Los aminoácidos sirven como fuente de energía, tampones intracelulares del pH, y como “pool” para la síntesis proteica. Se ha demostrado que la retirada de ciertos aminoácidos, así como la inclusión de otros pueden llegar a mejorar las condiciones de cultivo (Gardner, 1996). Muchos aminoácidos, como la fenilalanina, tirosina, lisina, valina y treonina son muy poco utilizados por las células embrionarias, mientras que otros, como la glutamina, son activamente metabolizados y muy utilizados como fuente de energía durante el desarrollo embrionario (Rieger *et al.*, 1992).

Las vitaminas juegan un importante papel como coenzimas en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos, igualmente está demostrado que las vitaminas hidrosolubles son necesarias para la expansión del blastocisto y la salida de la zona pelúcida (Takahashi y First, 1992).

e. Hormonas

Existe clara evidencia de que algunas hormonas, como es la insulina, tienen un gran efecto sobre el desarrollo de los embriones. Su adición a los medios de cultivo resulta en un

incremento de las tasas de desarrollo morfológico y del transporte de glucosa al blastocisto (Gardner, 1996). La suplementación con hormonas, tales como LH, FSH y estradiol 17 β , en los medios de maduración de los ovocitos bovinos, ofrecen efectos beneficiosos sobre el porcentaje de complejos cúmulo-ovocito (COC) que son capaces de completar la maduración meiótica con el consecuente desarrollo *in vitro* (Saeki *et al.*, 1991).

f. Antibióticos

Los medios de cultivo suelen ser complementados de forma estandarizada por 0.1% de antibióticos para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminantes y para prevenir la expansión de patógenos (Riddel *et al.*, 1985).

2.2.8. Requerimientos fisiológicos

a. pH

El pH del medio de cultivo debe estar entre 7.2 y 7.4; mientras que en los medios de fecundación se recomienda un nivel ligeramente superior (7.6 - 7.8). La adición de suero fetal y albumina sérica bovina, tiende a bajar el pH en 0.1. Muchos medios para cultivos contienen niveles de bicarbonato que controlan el pH y son normalmente equilibrados con el gas, previo a realizar el cultivo, lo que genera que el mismo se mantenga alrededor del 7.4 (Kim *et al.*, 1993).

b. Gas ambiente

La presencia de oxígeno es indispensable en el desarrollo del embrión, debido a que previene de la formación de radicales libres, que provocan la peroxidación de lípidos contenidos en los embriones, lo que resulta en daños en los embriones bovinos (Nagao *et al.*, 1994).

Nagao *et al.*, (1994) encontraron una mayor tasa de producción y mejora de la calidad del embrión cuando el cultivo se realizó con 5 por ciento de O₂. Se demostró más tarde que la concentración de O₂ en el útero de los mamíferos se encuentra en el intervalo de 5 a 8% (Gardner, 1996).

La interacción entre el medio de cultivo y la atmósfera gaseosa se presenta como un elemento altamente estratégico en la producción de embriones *in vitro*. El CO₂ utilizado en el cultivo

de embriones varía entre el 5% -7%, mantener este nivel es importante para el éxito de la producción *in vitro* de embriones, ya que los aumentos disminuye el desarrollo embrionario (Yuan *et al.*, 2003; Kitagawa *et al.*, 2004).

Cuando existe una mayor concentración de CO₂, mayor es la acidez del medio, la exposición de cigotos a un pH alto reduce significativamente su capacidad de desarrollarse a blastocisto, entonces es necesario evitar las fluctuaciones del pH durante la manipulación y cultivo (Gardner, 1996).

2.2.9. Efectos del cultivo *in vitro* sobre la calidad del embrión

Entre todas las etapas involucradas en la producción de embriones *in vitro*, el cultivo es el que ejerce un efecto mayor sobre su desarrollo, morfología y metabolismo, ya que los embriones se mantienen en el medio de cultivo por un máximo de ocho días (Thompson, 1997); estando expuestos a una variedad de situaciones que normalmente no se producen en su desarrollo *in vivo*, que pueden silenciar o potenciar la expresión de un gen, particularmente en un momento crítico de desarrollo (Niemann *et al.*, 2000).

Los efectos perjudiciales del cultivo en condiciones subóptimas pueden ser percibidos por la dificultad de que los embriones sean criopreservados o concretar la preñez (Lonergan *et al.*, 2003). Los medios de cultivo no sólo influyen en el desarrollo embrionario, sino también en la respuesta embrionaria post descongelación, es así que la viabilidad de los embriones criopreservados por el método convencional o la vitrificación varía (Nedambale *et al.*, 2004). Por lo tanto, al mejorar el cultivo se puede conducir a mayores tasas de supervivencia de los embriones después de criopreservación (Vajta *et al.*, 1996). Una amplia variedad de sistemas de cultivo se ha aplicado para producción de embriones *in vitro*, tanto a nivel comercial como experimental (Marquant *et al.*, 1998). Entre los componentes añadidos a los medios, para mejorar el desarrollo, está la proteína (albúmina de suero) y suero fetal bovino (Lonergan *et al.*, 2006).

2.2.10. Suero fetal bovino (FBS) en el cultivo *in vitro* de embriones

La adición de suero en el medio de maduración y de cultivo *in vitro* (MIV y IVC, respectivamente), aumenta la eficiencia de su producción, debido al aporte de nutrientes, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas, y componentes antioxidantes, que contribuyen a la maduración del ovocito y al desarrollo embrionario (Hoshi, 2003);

asimismo, proporciona factores de crecimiento, sustratos de energía, así como protección contra radicales libres, que generalmente mejoran la tasa de producción de blastocitos (Gomes y Diez, 2000); acelera la cinética de su desarrollo, después de la primera división celular, promueve la blastulación y aumenta el porcentaje total de blastocistos con un mayor número de células, y además incrementa la tasa eclosión (Lonergan *et al.*, 2003).

Sin embargo, la presencia de suero en el medio de cultivo puede inducir a la acumulación anormal de lípidos, haciéndolo sensibles a problemas de criopreservación (Abe *et al.*, 1999 y Hoshi, 2003), la razón por lo cual esto ocurre no se conoce por completo. De acuerdo con Abd El Razek *et al.* (2000), este aumento se produce principalmente por la síntesis de triglicéridos que altera el metabolismo de lípidos mitocondrial, conllevando a un mayor almacenamiento citoplásmico (Abe y Hoshi, 2003).

2.3. DESARROLLO EMBRIONARIO

Muchos eventos importantes se producen durante el desarrollo embrionario, desde la etapa de cigoto a la formación de blastocisto. Esto incluye la activación del genoma embrionario en la etapa de entre 08 - 16 células; compactación de mórula en el día 5, que implica el establecimiento del primer contacto célula-célula y la formación de blastocisto, entre los días 6 y 7, que establece la diferenciación de los dos tipos de células: el trofoblasto y la masa celular interna (Lonergan *et al.*, 2003). Para el desarrollo adecuado, un embrión debe ser capaz de responder a los cambios en su medio ambiente. Los estudios de las respuestas del embrión a diversos cambios en su microambiente como: calor, pH, anoxia, entre otros, aún es reducida (Chandolia *et al.*, 1999).

2.3.1. Etapas del desarrollo del embrión

- Mórula: masa de al menos 16 células, cuyos blastómeros son difíciles de diferenciar individualmente. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
- Mórula compacta: masa compacta cuyos blastómeros individuales se han unido. La masa del embrión ocupa 60 a 70% del espacio perivitelino.
- Blastocisto temprano: se observa en el embrión una cavidad llena de fluido denominada blastocele. El embrión ocupa el 70 a 80% del espacio perivitelino. A principios de esta etapa de desarrollo, el embrión puede aparecer de dudosa calidad.

- Blastocisto: evidencia pronunciada diferenciación de la capa exterior y el trofoblasto de la masa celular interna se aprecia más compacto y más oscuro. El blastocele es muy prominente, ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
- Blastocisto expandido: el diámetro total del embrión aumenta dramáticamente, con un adelgazamiento concurrente de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original.

2.3.2. Evaluación de calidad

La International Embryo Transfer Society (IETS), clasifica los embriones de acuerdo a los criterios desarrollados por Linder y Wrigth (1983). La IETS asigna códigos que evalúan la calidad del embrión, los que varían de "1" a "4", (Figura N° 2) de la siguiente manera:

- Código 1: Excelente o bueno. Masa simétrica y esférica. Embrión con blastómeros individuales (células) uniformes en tamaño, color y densidad; consistente con la etapa de desarrollo esperado. El 85% del material celular del embrión debe estar intacto, viable.
- Código 2: En forma general, irregularidades moderadas en la masa del embrión, tamaño, color y la densidad. Al menos el 50% del material celular del embrión debe estar intacto, viable.
- Código 3: Pobre. Irregularidades en forma de la masa embrión y el tamaño, el color y la densidad. Al menos el 25% del material celular del embrión debe estar intacto, viable.
- Código 4: Embriones degenerados, con células no viables.

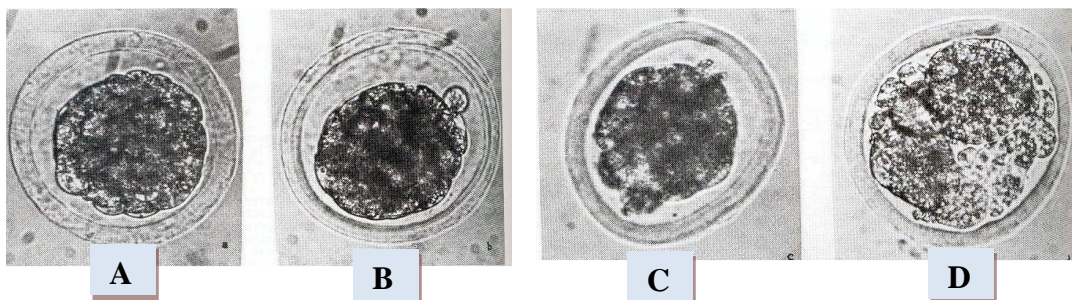


Figura N° 2: Mórulas compactas: a) Código 1, b) Código 2, c) Código 3, d) Código 4. (Lindner y Wright, 1983)

El Manual de la IETS aclara que la evaluación visual de los embriones es una evaluación subjetiva de un sistema biológico, no es una ciencia exacta.

2.3.3. Diferencias entre los embriones producidos *in vitro* e *in vivo*

Los embriones producidos *in vitro* muestran significativa diferencia de los producidos *in vivo*, en metabolismo, morfología, densidad, número de las células, alteración estructural de la zona pelúcida (más resistente a la eclosión), menor grado de compactación celular, incremento del contenido lipídico intracelular (Mohan *et al.*, 2002; Lonergan *et al.* 2006); además de presentar el citoplasma oscuro, blastómeras más hinchados, tasa crecimiento lento (Fair *et al.*, 2001), mayor sensibilidad a la congelación, y menor capacidad de soportar la criopreservación (Fair *et al.*, 2001; Leoni *et al.*, 2002). Los embriones *in vitro* tienen tasas de preñez significativamente menores que los producidos *in vivo* (Dobrinsky, 2002).

Es aceptable que los embriones producidos *in vitro* tengan menor calidad que los producidos *in vivo*, ya que sus condiciones de la producción no simulan perfectamente el medio en que se desarrolla un embrión *in vivo* (Lonergan *et al.*, 2006). Sumando a esto las condiciones subóptimas en las que se desarrolla el ovocito durante la maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV), sistema de cultivo embrionario, y el uso de medios para la producción *in vitro*. Cuanto más se prolonga el tratamiento de los embriones *in vitro*, mayores son sus diferencias con los producidos *in vivo* (Rizos *et al.*, 2008). Condiciones que pueden influir en su supervivencia después de la criopreservación; observándose retraso en la compactación de los blastómeros, cambios en la expresión génica, aumento de la cantidad de lípidos, que a su vez pueden contribuir al aumento de su sensibilidad térmica (Pugh *et al.*, 2000). Es así que la incidencia de apoptosis es mayor, probablemente inducida por el estrés causado por el cultivo *in vitro* (Levy *et al.*, 2001).

2.4. CRIOBIOLOGÍA

La criología se encarga del estudio de los procesos de criopreservación, que tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajo cero, generalmente entre -80 y -196 °C., lo que permite disminuir las funciones vitales del embrión y mantenerlo en condiciones de vida suspendida de manera indefinida; habiéndose convertido en una herramienta tecnológica esencial de la reproducción asistida y la biotecnología (Mazur, 2012). Las células embrionarias deben permanecer sin daño y fisiológicamente funcionales, para lo cual los embriones al ser congelados, primero son suspendidos y equilibrados en una solución conteniendo agentes crioprotectores (Leibo y Loskutof, 1993).

2.4.1. Criopreservación

La criopreservación tiene como objetivo mantener el metabolismo celular en un estado de quiescencia, lo que permite el almacenamiento de células y tejidos indefinidamente (Rodrigues, 1992). Uno de los principios básicos de la criopreservación es la eliminación del agua de las células, como sea posible, antes de proceder con la congelación, evitando la formación de cristales de hielo, con el consiguiente daño a las estructuras celulares (Seidel, 1986; Pickett 1986).

La congelación provoca un aumento de la osmolalidad en la célula. En respuesta a esta tensión, el agua sale de la célula y entra en el soluto, es así como termina el proceso cuando la concentración de soluto se vuelve lo suficientemente grande como para evitar cambios futuros por la congelación (Pugh *et al.*, 2000).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc; es decir, se reduce drásticamente la actividad fisiológica de la célula. De esta manera es posible almacenar embriones durante un largo período sin afectar su viabilidad (Ávila *et al.*, 2006). Sin embargo, no es un proceso exento de problemas, ya que puede inducir variaciones en las propiedades químicas, biológicas, que pueden alterar las membranas celulares y los organelos. La mayoría de las células de mamíferos mueren cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución que las proteja (crioprotectores), y a rangos de enfriamiento y calentamiento específicos (Ávila *et al.*, 2006).

Para encontrar las condiciones ideales para la criopreservación de embriones, es esencial conocer los mecanismos por los que los embriones son dañados en cada protocolo o procedimiento (Massip *et al.*, 1995). Los métodos de congelación tratan de mantener un delicado equilibrio entre los diversos factores perjudiciales tales como: la formación de cristales de hielo, choque osmótico, efectos tóxicos de crioprotectores, ruptura de la zona pelúcida y los cambios en el citoesqueleto y orgánulos celulares (Seidel, 2006). Palasz y Mapletoft (1996) se refirieron a la importancia de inducir la cristalización en el medio extracelular ("siembra") que precede a la congelación del medio que contiene los embriones.

Los embriones congelados permiten utilizar eficientemente donantes y receptoras, facilitando el progreso genético a bajo costo; permitiendo la comparación de los valores de cría del embrión y el de su transporte, frente a los animales en pie, transferir algunos embriones y conservar el resto hasta tener receptoras disponibles en el momento apropiado (Celestinos y Gatica, 2002).

La técnica de criopreservación de embriones de mamíferos más utilizada a nivel mundial es la congelación lenta o estándar, la cual hace uso de equipos programables que descienden la temperatura a una tasa constante; sin embargo, la implementación de técnicas avanzadas de criopreservación como la vitrificación, surgen como una alternativa factible, ya que no se requieren de los equipos descritos anteriormente (Fahy, 1985).

2.4.2. Características de los embriones producidos *in vitro* relacionados a baja congelabilidad

Los embriones *in vitro* criopreservados tienen las tasas de sobrevivencia bajas en relación a las de embriones producidos *in vivo* (Alvarenga *et al.*, 2007). La razón de esta variación es, probablemente, por las características físicas, que hacen que los embriones *in vitro* sean más sensibles cuando están expuestas a bajas temperaturas (Dinnyés y Nedambale, 2009). Se dan diferencias morfológicas, como el aumento de vacuolas (Shamsuddin *et al.*, 1992), mayor fragilidad de su zona pelúcida, menor número de blastómeros de la masa celular interna (Rizos *et al.*, 2002), cambios en la expresión génica (Lonergan *et al.*, 2003), mayor incidencia de apoptosis, y aumento en contenido citoplásmico de lípidos (Massip *et al.*, 1995). Por estas razones, y especialmente la última, la criopreservación disminuye en gran medida la viabilidad de los embriones *in vitro* (Pereira y Marques, 2008).

A pesar de la amplia investigación desarrollada para aumentar la producción de blastocistos en los laboratorios, la calidad de los embriones producidos *in vitro*, en términos de supervivencia después de la criopreservación, se ha mantenido por debajo de la lograda con los embriones producidos *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002). La supervivencia, después de la criopreservación de los embriones producidos *in vitro*, está relacionada con la calidad del embrión (Lonergan *et al.*, 2006) y la calidad del crioprotector utilizado (Agca *et al.*, 1996).

La obtención de mayor número de embriones *in vitro* criotolerantes va más allá de los cambios en los protocolos de criopreservación, ya que también implica cambios en los

sistemas de cultivo empleados en el proceso. Leibo y Loskutof (1993), eliminaron parcialmente las gotas de lípidos del embrión por centrifugación, obteniendo mejoras en la supervivencia después de la criopreservación. El mecanismo por el cual los lípidos disminuyen la capacidad de los embriones a sobrevivir a la criopreservación aún no está plenamente establecido (Leibo, 2008).

2.4.3. Tasa de enfriamiento

El tiempo es un factor importante, ya que las células podrían ser sometidas a diferentes tasas de enfriamiento: lenta, moderada, rápida. Ésta ejerce un profundo efecto en la manera como se forman los puentes de hidrogeno (núcleos de hidrógeno), y por consiguiente la formación de cristales de hielo. En tasas de enfriamiento lento, la unión de los puentes de hidrogeno crece lentamente en grandes cristales, en tasas de enfriamiento más elevadas, la unión y reacomodación de las moléculas de hidrogeno es mínima de manera que los cristales son mucho más pequeños (Leibo y Loskutof, 1993).

El proceso de congelación se da a una temperatura de 0°C con la presencia de núcleos, que son grupos de moléculas unidas por puentes de hidrógeno que facilitan la cristalización (Vajta, 2000). Una vez iniciada la cristalización se da la liberación de energía, necesaria para alcanzar el punto de congelación, momento donde casi toda el agua en estado líquido es convertida a hielo (Ávila *et al.*, 2006).

2.4.4. Crioprotectores

Independientemente de la técnica de congelación, todos los métodos de criopreservación requieren la presencia de un crioprotector, cuya función es proteger las células y tejidos durante la congelación y calentamiento (Leibo *et al.*, 1973). Durante los últimos años se han desarrollado diversas técnicas para la criopreservación de embriones; sin embargo, a pesar de los efectos beneficiosos de los crioprotectores, no hay técnica de criopreservación que permita una supervivencia del 100 por ciento, después de la congelación y descongelación (Arnold *et al.*, 1983). Los crioprotectores son generalmente diluidos en solución salina tamponada con fosfato (fosfato Buffered Saline - PBS). Sin embargo, también se han reportado medios como TCM-199 (medio de cultivo tisular - 199), TCM-199 / Hepes (Hamano *et al.*, 1992 y Vajta *et al.*, 1998).

Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso (Saha *et al.*, 1996). Las diferencias en las dimensiones moleculares de los agentes crioprotectores, tanto como las propiedades de las membranas celulares, hacen que estos tengan diferentes tasas de permeabilidad hacia las células. Además, los diferentes estadios de desarrollo embrionario, desde ovocito hasta cigoto, varían el grado de permeabilidad para un mismo agente crioprotector. Finalmente, los embriones u ovocitos de diferentes especies animales, aun siendo del mismo estadio de desarrollo embrionario, también exhiben diferencias en la permeabilidad frente al mismo agente crioprotector (Leibo y Loskutof, 1993).

Los crioprotectores se dividen en dos categorías: intracelular o permeable y extracelulares o no permeables. Una de las funciones de los crioprotectores intracelulares es bajar el punto de congelación; estos proporcionan un tiempo más largo para que ocurra de la deshidratación de la célula, disminuyendo la formación de cristales de hielo intracelular y la prevención de daño tóxico y osmótico; entre los principales crioprotectores de este tipo se tiene al dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol, glicerol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, amidas (Kasai, 1996 y Young *et al.*, 1998).

Los crioprotectores extracelulares incluyen azúcares como galactosa, glucosa, trehalosa, manitol, sorbitol y sacarosa. Por tener alto peso molecular permanecen en el medio extracelular y se usan asociados a crioprotectores intracelulares (Hasler *et al.*, 1997). Los crioprotectores extracelulares interaccionan con la membrana celular, ejerciendo una acción estabilizadora durante el cambio de un estado relativamente líquido a otro sólido (Seidel, 1986).

2.5. MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Durante los últimos años se han desarrollado para la criopreservación de embriones varias técnicas, es así que diversas sustancias crioprotectoras se han utilizado en diferentes concentraciones y combinaciones. (Landim e Alvarenga, 1995). Aun se sigue desarrollando investigaciones en criobiología, ya que este sigue siendo un desafío para asegurar la supervivencia después de la criopreservación de embriones cultivados *in vitro* en las tasas similares a los obtenidos con los producidos *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002).

Los ovocitos bovinos recuperados de ovarios de matadero se han convertido en una fuente ampliamente utilizada para procedimientos tales como la fecundación *in vitro* u otras tecnologías reproductivas relacionadas. En la actualidad ya es posible criopreservar ovocitos y embriones de algunas especies de mamíferos mediante los protocolos de congelación y vitrificación (Fahning y García, 1992).

2.5.1. Congelación lenta o tradicional

La congelación lenta, tiene una ventaja comparativa frente a los otros métodos de criopreservación, ya que permite la utilización de bajas cantidades de crioprotectores y la transferencia directa de los embriones después del descongelamiento (Volkel y Hu, 1992). Sin embargo, su capacidad de prevenir la formación de hielo es aún limitada, y sus resultados *in vitro* son variables (Massip *et al.*, 1995; Kaidi *et al.*, 2001; Hasler, 2010) y menores, en comparación a los datos obtenidos en embriones *in vivo* (Dinnyes y Nedambale, 2009).

El método convencional o de congelación lenta consiste en colocar los embriones en la solución de equilibrio de etilenglicol o glicerina como crioprotector, a temperatura ambiente; lo cual permite que el agua fluya hacia el exterior a través de la membrana plasmática y el contenido celular llegue a concentrarse, debido a la deshidratación gradual, minimizando la posible formación de cristales de hielo en el interior de la célula. La curva de enfriamiento se realiza con la ayuda de una máquina de congelación, que puede ser programable (Mochida y Ogura, 2010).

El procedimiento, adaptado por Niemann (1991), para la congelación de embriones considera: i) el equilibrio de los embriones en el crioprotector; ii) el llenado de los embriones en pajillas de 0,25 ml, con tres columnas centrales, separadas por dos columnas de aire, estando el embrión en la columna central; iii) ubicación de las pajillas en el congelador a -7°C ; iv) inducción de la cristalización o *seeding*, después de 5 minutos, tocando el extremo superior con un elemento metálico enfriado en nitrógeno líquido, evitando el sobre enfriamiento; y, v) descenso de la temperatura a $0,3^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta -32°C . Al alcanzar esta la temperatura, las pajillas pueden ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento (Mochida y Ogura, 2010). Si el descenso térmico llegase a ser demasiado rápido, el agua no saldría de éstas células, lo que daría paso a la formación de cristales de hielo.

En la congelación lenta o convencional, los principales objetivos son equilibrar las células con los crioprotectores y minimizar la formación de grandes cristales de hielo (Mavrides y Morrol, 2002; Cuello *et al*, 2008). La congelación lenta busca mantener el balance entre la velocidad de enfriamiento (0.2-0.3°C/min), la velocidad de deshidratación, y la velocidad de formación de núcleos de hielo, de manera que se produzca la penetración de un crioprotector en la célula, produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la formación de cristales de hielo (Vajta, 2000).

2.5.2. Vitrificación

La vitrificación es una técnica más simple y menos costosa, y requiere menos tiempo en relación a los demás métodos de congelación (Dobrinsky, 2002). Consiste en la solidificación de una solución a bajas temperaturas, no por cristalización, si no por elevación de su viscosidad llegando a una condición similar al vidrio, tomando de ahí su nombre; siendo necesario el aumento de la velocidad de enfriamiento y una alta concentración de crioprotectores, de manera que en conjunto eviten la formación de cristales de hielo, seguido de la inmersión directa en nitrógeno líquido (Martino *et al.*, 1996 y Vajta, 2000). Necesita de concentraciones de crioprotectores mayor (4-8 M) a las utilizadas normalmente en el congelamiento (1-2 M) (Woods *et al*, 2004). Todo el procedimiento, desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido no requiere más de 10 minutos. Esto representa una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2500°C/min (Vajta, 2000).

Debido a sus efectos benéficos, esta metodología ha tomado importancia en la criopreservación, no solo de embriones *in vitro*, sino también de ovocitos y embriones *in vivo*. Desde el primer procedimiento, realizado en mamíferos por Fahy en 1985, la vitrificación ha sufrido múltiples modificaciones, en el intento de simplificar sus procedimientos y mejorar las tasas de viabilidad. Inicialmente, varios de los estudios se enfocaron en la disminución los efectos tóxicos y osmóticos causados por las altas concentraciones de crioprotectores (Gonçalves *et al.*, 2002 y Kasai y Mukaida, 2004).

La disminución de los efectos tóxicos se obtiene a través del uso de crioprotectores menos tóxicos y de menores volúmenes y niveles de concentración, así como de su temperatura y tiempos de exposición (Kasai, 1996 y Liebermann *et al*, 2002). Sin embargo, si la exposición es demasiado corta, la penetración del crioprotector no será suficiente, generando la formación de hielo intracelular. Sobre esta base, muchos protocolos de vitrificación se han

desarrollado y cambiado con el fin de disminuir las lesiones en los embriones (Kasai, 1996 y Kim *et al.*, 2008).

Entre los crioprotectores ampliamente utilizados se tiene al etilenglicol (EG). Sin embargo, varios experimentos sugieren que crioprotectores como 1-2 propanediol (PROH), glicerol (GLY), dimetilsulfoxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), y sus posibles combinaciones con otros crioprotectores, son igualmente candidatos para ser empleados en la vitrificación (Massip, 2003). La asociación comúnmente utilizada en vitrificación es la compuesta por EG y DMSO (Vajta y Nagy, 2006), sin embargo esta puede ser reemplazada por otro tipo de asociaciones de agentes crioprotectores, como el EG y PROH, obteniendo excelentes resultados en la vitrificación de embriones producidos *in vitro* y ovocitos inmaduros (Vieira *et al.*, 2008). La adición de crioprotectores no permeables, tales como disacáridos (sucrosa, trehalosa) o macromoléculas (Ficoll), polivinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), igualmente van a ayudar en la reducción de la toxicidad de los crioprotectores, ya que disminuye los niveles de crioprotector dentro de las células (Liebermann *et al.*, 2002; Kasai y Mukaida, 2004)

Es necesario que el volumen de la solución vitrificante, donde se aloja el embrión, sea lo más pequeño posible, para lograr que la velocidad de enfriamiento sea lo suficientemente rápida, y evitar así la formación de cristales de hielo, la cual se ha de sumergir bruscamente en nitrógeno líquido donde se solidifica, de manera que el agua intracelular no tenga tiempo para ello, con consecuentes daños a los organelos intracelulares, lo que incrementa su potencial de supervivencia (García *et al.*, 2008).

Los primeros dispositivos utilizados con éxito en la vitrificación de oocitos y embriones, fueron las pajuelas de inseminación, las cuales utilizaban grandes volúmenes de crioprotectores (>20 μ L), que solo alcanzaban tasas de enfriamiento de 2500°C/min (Palasz y Mapletof, 1996). Posteriormente, con la invención de dispositivos de menor volumen (<5 μ L), se consiguió aumentar las tasas de enfriamiento hasta casi los 30.000°C/min; la mayoría de los cuales permitieron además la disminución del contacto con los crioprotectores, reduciendo el daño tóxico y mecánico causado por la vitrificación. Entre los innumerables dispositivos creados están: i) la gota de tamaño mínimo (MDS) (Arav, 1992); ii) los electron microscope grids (EM) (Martino *et al.*, 1996); iii) las pajillas abiertas y estiradas open-pulled straw (OPS) (Vajta *et al.*, 1998); iv) los cryoloop (Lane *et al.*, 1999); y, v) las micropipetas

plásticas de diámetro fino (Cremades *et al.*, 2004). Entre estos, el envase más usado son las OPS, que permite tasas de enfriamiento de más de 20,000 °C/min; disminuyendo los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta *et al.*, 1998).

Sin embargo, posteriores modificaciones de las OPS consiguieron aumentar aún más las tasas de enfriamiento, al utilizar para su fabricación diferentes materiales distintos al plástico. El plástico debido a sus características físicas, tiene una baja conductividad de calor, que limita las tasas de congelamiento, por lo tanto el uso de otros materiales con mayor conductividad, como el vidrio y el metal (Mezzalana *et al.*, 1999), permiten aumentar el intercambio de calor y las tasas de enfriamiento, alcanzando velocidades de casi 30.000°C/min. Varios autores, demostraron tal eficiencia, al alcanzar mayores tasas de congelamiento con micropipetas de vidrio y mayores tasas de sobrevivencia post-vitrificación, debido a una mayor conductividad y la utilización de un menor volumen de crioprotectores (Cho *et al.*, 2002).

2.6. FACTORES QUE DETERMINAN LA TOLERANCIA A LA CRIOPRESERVACIÓN

La tolerancia a la criopreservación de los embriones puede depender de múltiples variables, que incluyen al mismo embrión y al procedimiento de laboratorio; si se les controla bien se puede tener éxito en la criopreservación de los embriones (Kaidi *et al.*, 2001). Entre las principales variables se pueden señalar:

a. Estadío del desarrollo embrionario

Se ha demostrado que los embriones en las primeras etapas de desarrollo son muy susceptibles a la congelación, comparado a aquellos en estado de desarrollo más avanzado, de mórula y blastocisto; debido a que, al ser las blastómeras más pequeñas, la pérdida de agua es más eficiente (Guignot, 2005). Asimismo, se ha demostrado que la velocidad de penetración del crioprotector se incrementa a medida que el desarrollo embrionario progresa; varios investigadores coinciden en que el estadío que ofrece mejor viabilidad es el de blastocisto, que varía en la edad dependiendo de la especie (Leibo y Loskutof, 1993).

b. Contenido de Lípidos

El contenido de lípidos de los embriones es un parámetro importante ligado tanto a la calidad como a su criotolerancia. Los cambios físicos de los lípidos sometidos a las temperaturas de congelación están entre las mayores causas de daño celular por criopreservación. No sólo los lípidos intracelulares, sino también la composición lipídica de las membranas contribuyen a la sensibilidad al enfriamiento. En condiciones *in vitro*, el contenido de lípidos puede estar influenciado por el ambiente de cultivo del embrión, es así que se atribuye éste a la presencia del suero fetal bovino (Abe *et al.*, 2002). Por esto, el cultivo de embriones en sistemas libres de suero fetal bovino reduce la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en los blastocistos bovinos y mejora su resistencia a la criopreservación (Abe *et al.*, 2002).

c. Calidad Embrionaria

La calidad embrionaria es uno de los factores que afecta directamente al resultado de la criopreservación; sin embargo, la clasificación de los embriones es realizada en forma subjetiva tomando los criterios como color, número y densidad de las células, tamaño del espacio perivitelino, entre otros, de manera que no es exacta. Está demostrado que la calidad del embrión es un predictor más exacto del éxito de la criopreservación (Linder y Wrigth, 1983).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

Las actividades experimentales del presente estudio se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva – “Carlos Rodríguez Villegas” de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

a. Ovarios

Se emplearon ovarios bovinos de animales beneficiados en el camal Yerbateros; los ovocitos obtenidos fueron madurados, fecundados y cultivados *in vitro*. Los embriones producidos fueron distribuidos al azar para ambos métodos de criopreservación.

b. Medios de cultivo

Los diversos medios utilizados para el presente estudio fueron:

- Búsqueda y aspiración de ovocitos:
 - Solución fisiológica;
 - Medio de aspiración - Solución buffer fosfato (PBS) suplementado con 1% de suero fetal bovino (FBS- Sigma Aldrich).
- Producción de embriones:
 - Medio de maduración (IVM - Vitrogen®, Brasil);
 - Medio de fertilización (IVF - Vitrogen®, Brasil);
 - Medio de capacitación espermática (Percoll 45%/90% - Vitrogen®, Brasil);
 - Medio de cultivo (IVC- Vitrogen®, Brasil);
 - Aceite mineral (Sigma Aldrich).
- Criopreservación de embriones:
 - Nitrógeno Líquido
 - Holding (Bioniche);
 - Etilenglicol (Vigro);

- Medio de vitrificación:
 - Solución de equilibrio (Vitrogen®, Brasil);
 - Solución de vitrificación (Vitrogen®, Brasil);
- Medio de desvitrificación:
 - Solución de descongelación (Vitrogen®, Brasil);
 - Solución de dilución (Vitrogen®, Brasil);
 - Solución de lavado (Vitrogen®, Brasil).

3.3. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Incubadora;
- C.A.S.A (Computer Assisted Sperm Analysis);
- Congelador de embriones;
- Platina caliente
- Microscopio;
- Estereoscopio;
- Baño María.

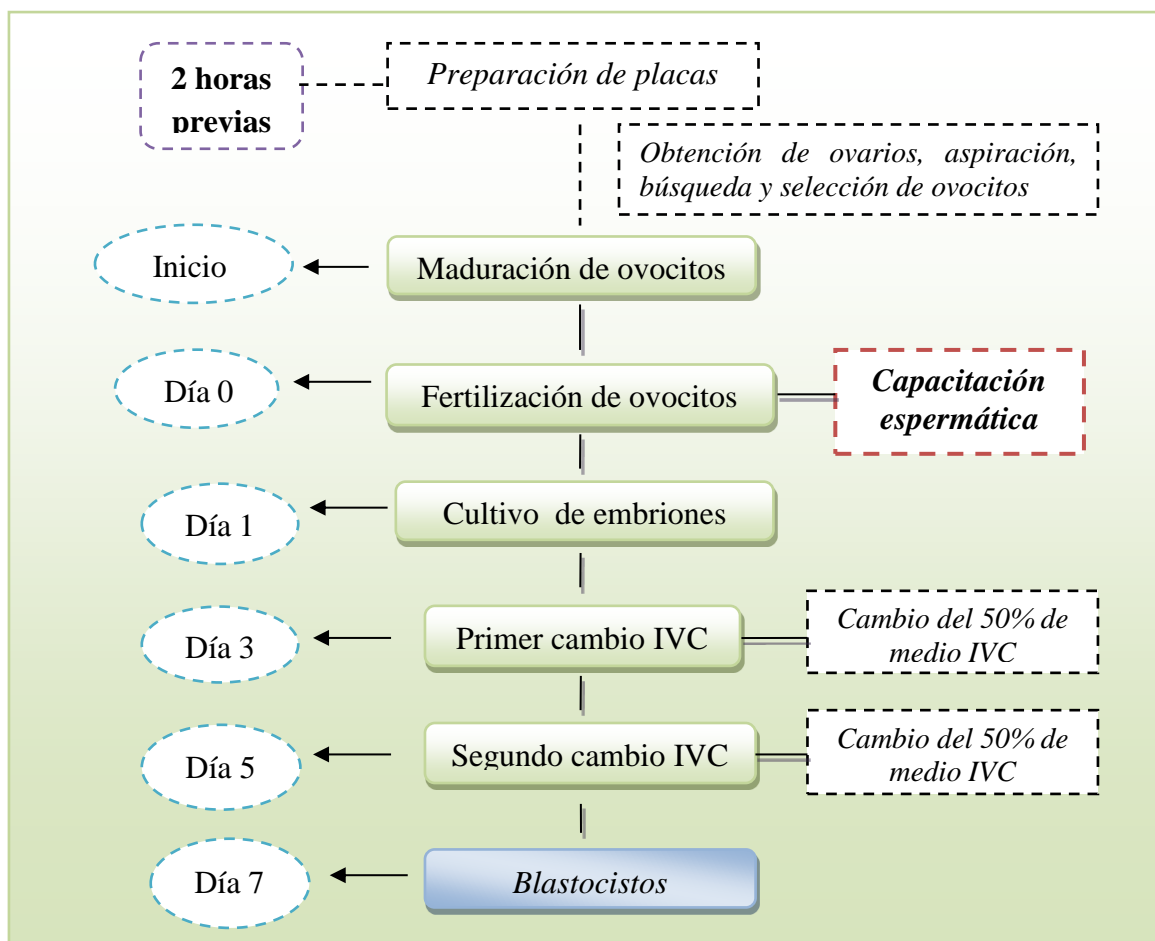
3.4. MATERIALES

- Placas Petri de 35x 10 mm (Falcon ® 1008);
- Filtros;
- Micropipetas de 10 ul, 100 ul y 1000 ul;
- Termos de boca ancha;
- Termómetro;
- Vaso de precipitación 500mL;
- Tubos conicos de 15 ml y 50 ml (Falcon ®);
- Jeringas de 5 ml y 10 ml;
- Agujas hipodérmicas N° 18G de 1 ½ pulgadas.

3.5. MÉTODO EXPERIMENTAL

3.5.1. PRODUCCIÓN DE BLASTOCISTOS *IN VITRO*

Figura N° 3: Proceso de producción de blastocistos *in vitro*



a. Preparación de placas

Previo al proceso de maduración, fertilización y cultivo de ovocitos o embriones, los medios utilizados para el lavado de los ovocitos y embriones, así como las placas preparadas (medio y aceite mineral), fueron equilibradas durante 2 horas en la incubadora a 38 °C con 5% CO₂. Las placas contenían de 5 a 7 microgotas de 70 µl de medio y 3.5 ml aceite mineral.

b. Manejo de ovarios

Los ovarios fueron obtenidos de bovinos beneficiados, los cuales fueron transportados en condiciones isotérmicas (37°C), al laboratorio de biotecnología reproductiva en solución fisiológica (NaCl -0,9%) a 37°C, el tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio fue inferior a 3 horas. Los ovarios fueron lavados de 2 a 3 veces con

solución fisiológica a 37 °C para eliminar restos de sangre, y conservar los mismos en solución atemperada, manteniéndolas en baño maría durante el proceso de aspiración.

c. Aspiración de ovocitos

Los complejo *cumulus oophorus* (COC's) se recuperaron de folículos de 3 a 8 mm mediante aspiración folicular, con ayuda de una jeringa y aguja N° 18. Para la aspiración fue necesario contar con la solución buffer fosfato (PBS) suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB). El líquido folicular aspirado se colocó en un tubo cónico de 50 ml (Falcon ®), el cual se mantuvo durante todo el proceso de aspiración en baño maría a 37°C para finalmente realizar el filtrado, búsqueda y selección de los ovocitos.

d. Búsqueda y selección de ovocitos

Los COC's obtenidos fueron visualizados bajo un estereoscópico a 40X de aumento, se clasificaron y calificaron en cuatro categorías (I, II, III y IV) de acuerdo al número de células del cumulus que cubre al ovocito (Leibfried y First, 1979). Para la presente investigación solo se consideraron como viables para el proceso de maduración *in vitro* los ovocitos de calidad I y II. Los ovocitos seleccionados fueron colocados en placas petri (35 x 15 mm) en medio H -199 (Vitrogen®, Brasil).



Figura N° 4: Manejo de ovarios y obtención de ovocitos: a) material necesario para el transporte de los ovarios, b) Lavado de los ovarios con solución fisiológica, para el retiro de restos de sangre, c) ovarios en baño maría (37°C) d) aspiración folicular, e) filtrado del contenido folicular, f) búsqueda de ovocitos.

e. Maduración *in vitro* de ovocitos

Para la maduración se realizó el lavado por tres veces de los COC's utilizando el medio H-199 (Vitrogen®, Brasil). y medio de maduración (IVM - Vitrogen®, Brasil) . Una vez lavados los COC's se transfirieron y cultivaron en el IVM (Vitrogen®, Brasil), a 38 °C con 5% CO₂ por 22 a 24 horas en grupos de 10, en microgotas de 70 µl cubiertas con aceite mineral estabilizada (Sigma Aldrich) en placas 35x 10 mm. (Figura N° 5)

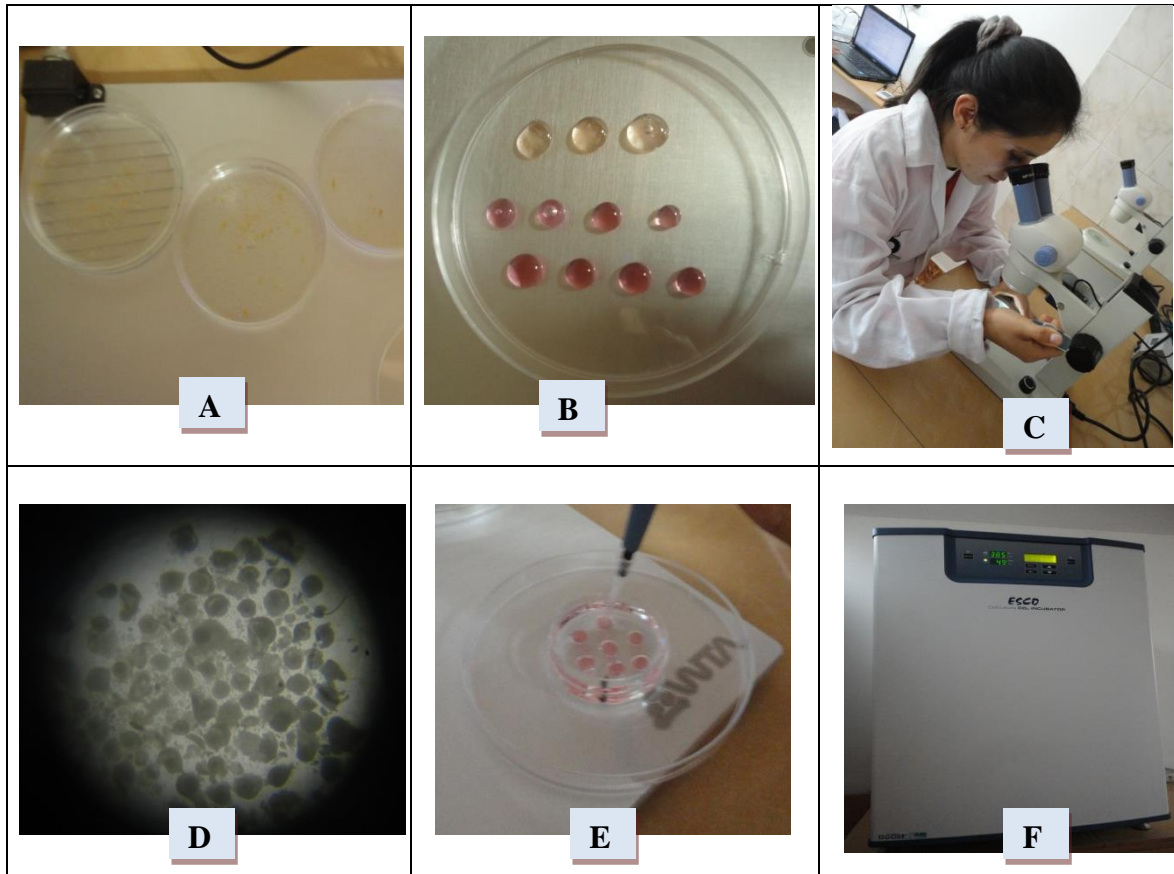


Figura N° 5: Maduración de ovocitos: a) placas con el líquido folicular en platina caliente, b) medio H-199 (IVM - Vitrogen®, Brasil) y medio de maduración *in vitro* (IVM - Vitrogen®, Brasil), c) localización y selección de ovocitos d) ovocitos de calidad I y II, e) placas con migrogotas del IVM, f) incubación de los ovocitos por 22- 24 horas a 38 °C con 5% CO₂.

f. Fertilización *in vitro* de ovocitos

Los COC's al término de las 22 - 24 horas de maduración, fueron retirados del medio de maduración para posteriormente ser lavados por tres veces en medio de fertilización (IVF-Vitrogen®, Brasil) y colocados en grupos de 10 en microgotas de 70 µl de IVF (Vitrogen®, Brasil) cubierta con aceite mineral, posteriormente se adiciono la suspensión de espermatozoide seleccionados y capacitados.

Para la fertilización se utilizó semen congelado de toros de probada fertilidad, una vez descongeladas las pajillas a 37 °C por 30 segundos, se procedió a evaluar la motilidad inicial (capacidad fecundante) del semen de manera objetiva, mediante el sistema computarizado de análisis de semen (C.A.S.A). La evaluación consistió en colocar 5 µl de semen en la placa y colocarla en la platina del microscopio donde se encuentra la cámara, para luego activar el software.

Se realizó la capacitación espermática mediante el método de gradientes de Densidad Percoll (45/90), para ello se colocó en un tubo Eppendorf 500 µl de percoll 45 en el gradiente superior, 500 µl de percoll 90 en la gradiente inferior y 250 µl de semen descongelado en la parte superior, llevándose a una primera centrifugación a 3000 RPM durante 15 minutos; con la finalidad de eliminar el crioprotector y diluyentes, terminada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado, al cual se agregaron 500 µl de medio de fertilización (IVF - Vitrogen®, Brasil), para finalmente ser centrifugado por segunda vez a 3000 RPM por 5 minutos. La motilidad espermática final se valoró mediante el sistema computarizado de análisis de semen (C.A.S.A). La fertilización se realizó adicionando 10 µl de solución de espermatozoides (concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml) a cada migrogota que contenia los ovocitos madurados. Se incubaron los ovocitos y espermatozoides por 18 horas a 38 °C, 90% humedad con 5% CO₂. (Figura N° 6)



Figura N° 6 Fertilización *in vitro*: a) medios para la fertilización y capacitación espermática, b) preparación de placas para la fertilización, c) descongelación de la pajilla de semen a 37°C, d) gradiente de densidad percoll (45/90), e) centrifugación del gradiente de percoll y semen, f) ovocitos madurados, g) evaluación de la motilidad espermática, h) placa con ovocitos y espermatozoides.

g. Cultivo *in vitro*

A las 18 horas post fertilización, los cigotos fueron desnudados por pipeteo, permitiendo así la remoción de las células del cúmulo, para posteriormente ser lavados tres veces en el medio de cultivo (IVC -Vitrogen®, Brasil), y transferidos al IVC (Vitrogen®, Brasil) durante 7 días, en microgotas de 70 µl bajo aceite mineral a 38 °C con 5% CO₂; el medio de cultivo fue cambiado en un 50% al tercer y quinto día, el cambio consistió en retirar 35 µl de medio IVC (Vitrogen®, Brasil) y agregar 35 µl de medio IVC nuevo . Los blastocistos obtenidos fueron clasificados de acuerdo a su morfología (de manera subjetiva) y asignados aleatoriamente a los métodos de criopreservación. (Figura N° 7)

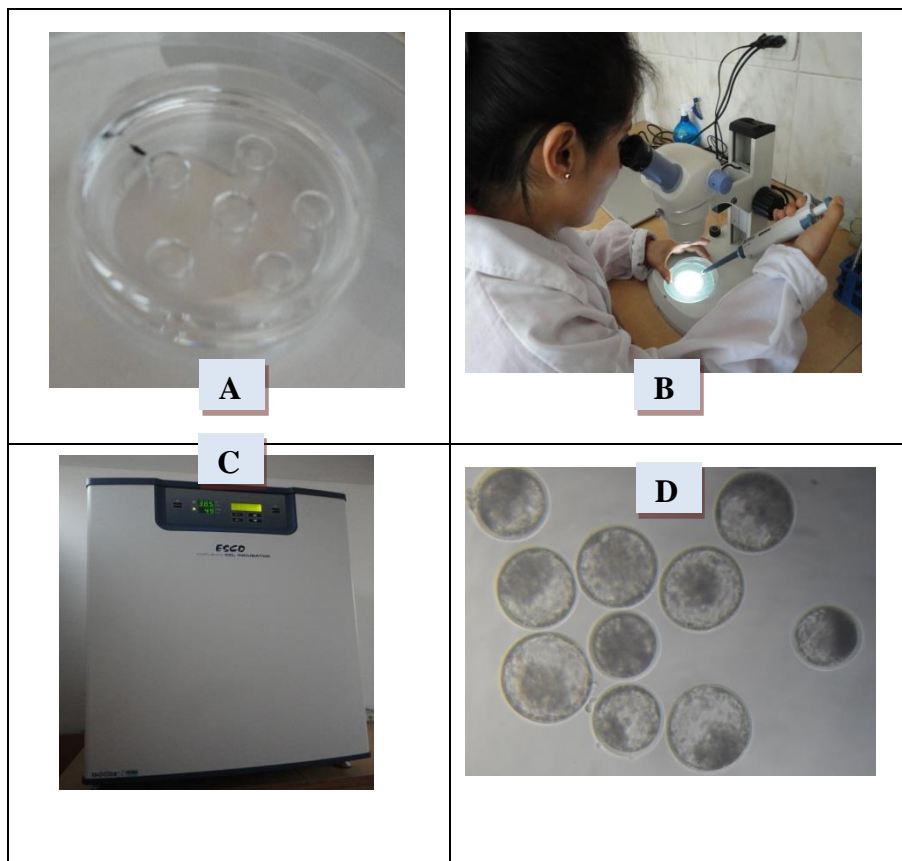


Figura N° 7: Cultivo de embriones: a) placa conteniendo supuestos cigotos, b) remoción de las células del cumulo, c) cultivo en incubadora d) Blastocistos (día 7).

3.5.2. CRIOPRESERVACIÓN DE BLASTOCISTOS

a. Congelación lenta

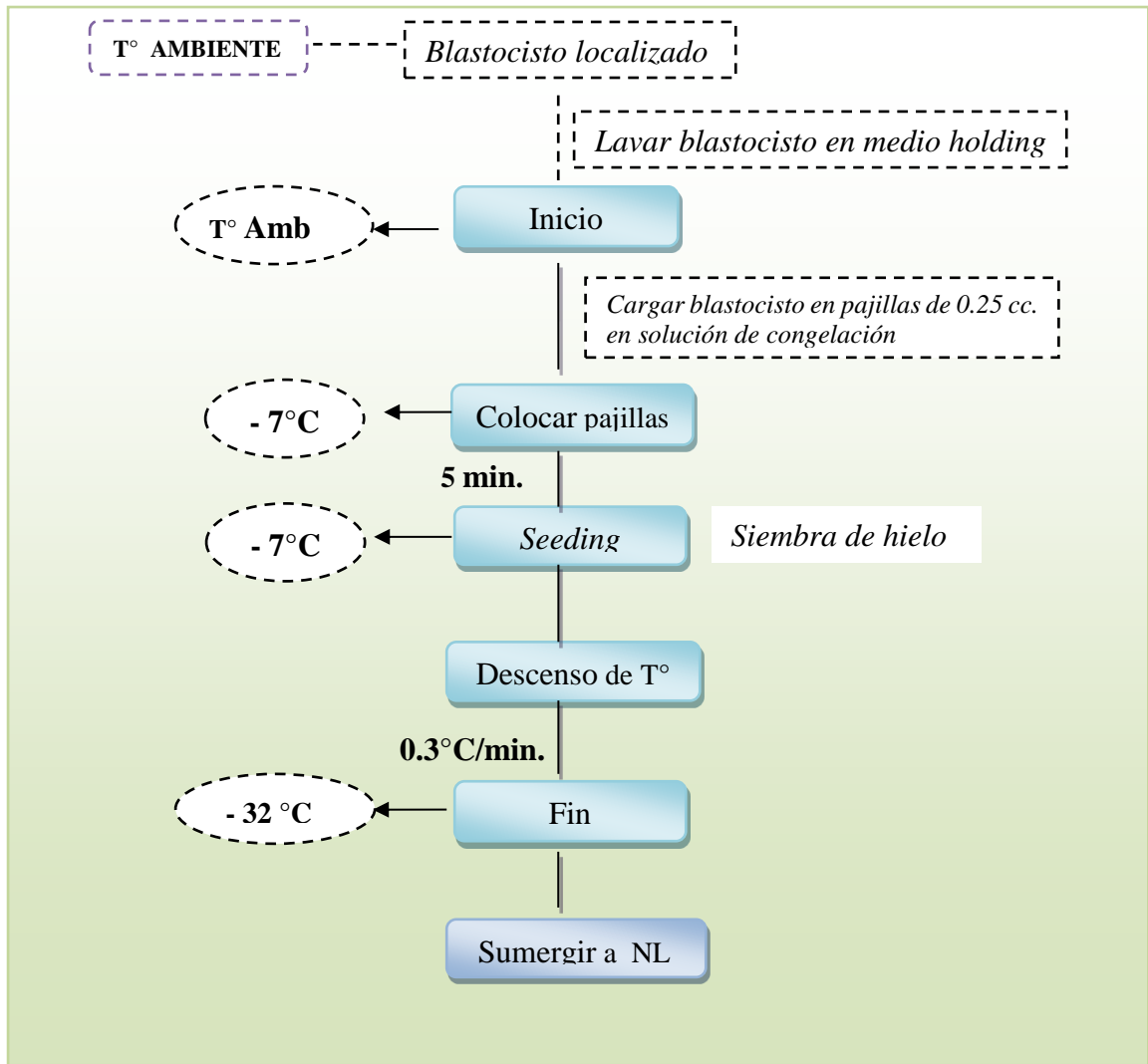
Los blastocistos fueron colocados en placas petri (35 x 15 mm) y lavados tres veces en medio holding (bioniche), para posteriormente ser lavados y expuestos al medio de congelación (Etilenglicol - vigro) a temperatura ambiente en microgotas de 60 μ l, e inmediatamente después empajilladas (pajillas plásticas de 0.25cc); las pajillas fueron selladas en el extremo contrario al tampón de algodón con alcohol polivinílico.

Las pajillas se colocaron en el equipo de congelación automática, cuando éste indicaba una temperatura de -7 °C, permaneciendo a esta temperatura durante 5 minutos; seguidamente se realizó el *seeding* (siembra de hielo) poniendo en contacto la superficie de la pajilla con un hisopo con nitrógeno líquido, posterior al *seeding* se monitoreo el descenso de la temperatura a una velocidad de 0.3 °C/ minuto hasta -32 °C, momento en que las pajillas se retiraron del equipo de congelación y fueron sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido. (Figura N° 8 y 9)

- *Descongelación*

La descongelación se realizó sumergiendo las pajillas en baño maría a 38 °C durante 30 segundos, el contenido de la pajilla fue vertido en una placa petri (35 x 15 mm), los blastocistos recuperados se lavaron en medio de cultivo (IVC - Vitrogen®, Brasil), para finalmente ser re cultivados por tres horas a 38 °C con 5% CO₂.

Figura N° 8 : Proceso de congelación lenta de blastocitos



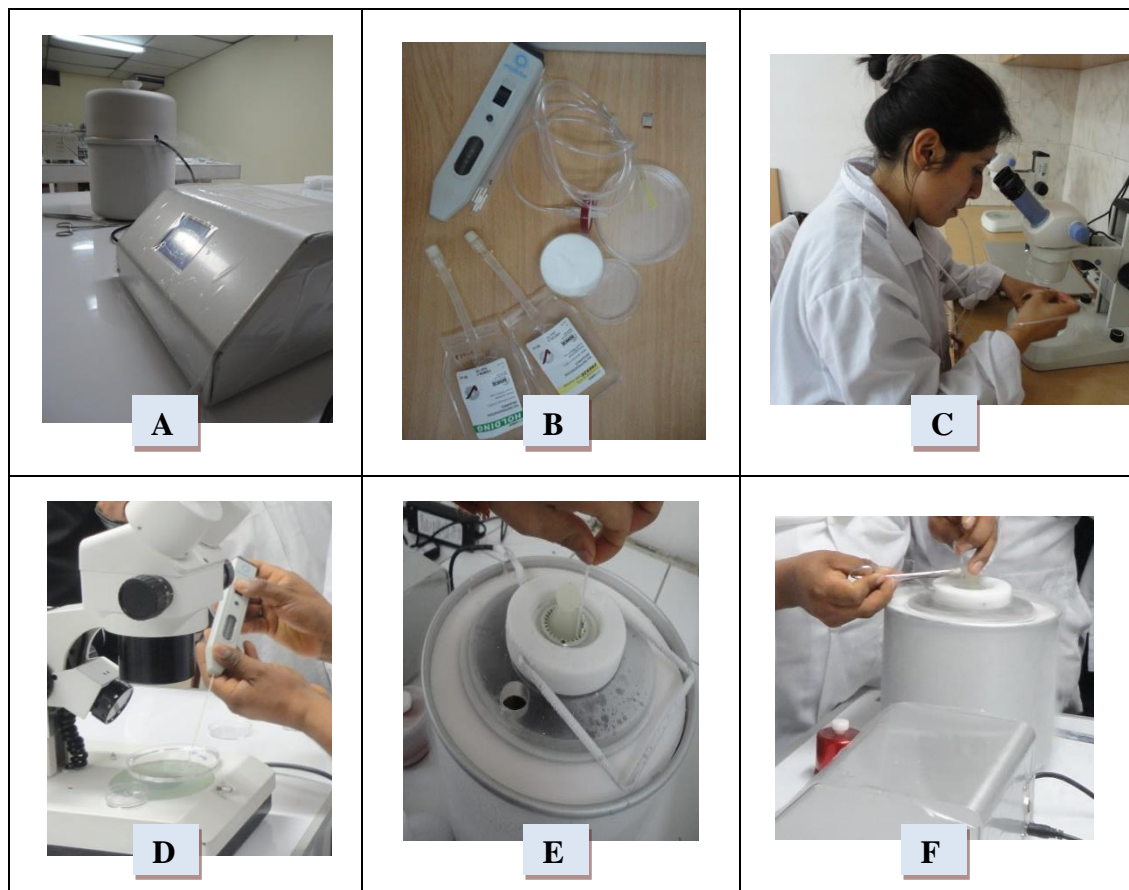


Figura N° 9: Congelación tradicional: a) Equipo de congelación automática b) materiales y medios holding - etilenglicol, c) Localización de blastocistos d) empajillamiento de blastocistos e) colocación en el equipo de congelación automática de las pajillas conteniendo los blastocistos f) seeding (siembra de hielo).

b. Vitrificación

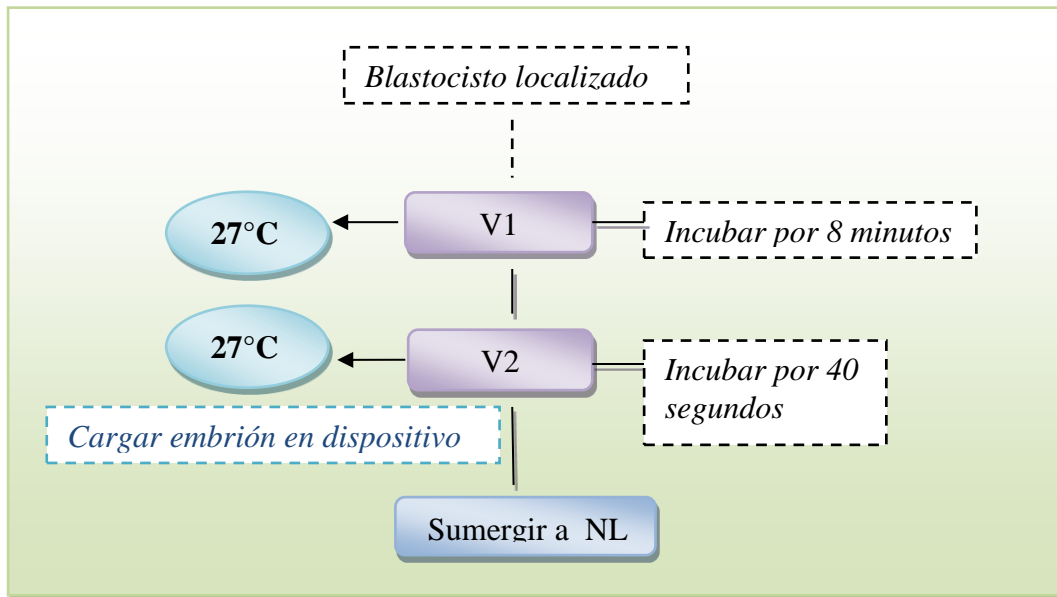
Los blastocitos fueron colocados en placas petri (35 x 15 mm) e incubados en solución de equilibrio (V1 - Vitrogen®, Brasil) por 8 minutos a 27°C, luego transferidos a la solución de vitrificación (V2 - Vitrogen®, Brasil) a 27°C por 40 segundos en microgotas de 60 µl, posteriormente cargadas en los dispositivos, los cuales fueron colocados en pajillas plásticas de 0.5 cc. e inmediatamente después sumergidos en nitrógeno líquido.

Los dispositivos se elaboraron a partir de microtubos de vidrio, los cuales fueron calentados en la porción la central, hasta el evidente reblandecimiento del vidrio, una vez logrado esto ambos extremos fueron traccionados hasta lograr la reducción del diámetro en la porción central y consecuentemente del grosor del microtubulo. Posterior a ello se cortaron los

microtubos en la sección más delgada haciendo uso de una fina lamina de lima de uñas. Se esterilizaron los dispositivos sometiéndolos a luz ultravioleta.

El volumen aproximado de la gota que contuvo la solución crioprotectora y el blastocisto fue de 2 μ l, siendo cargados estos al dispositivo por capilaridad.

Figura N° 10: Proceso de vitrificación de blastocitos



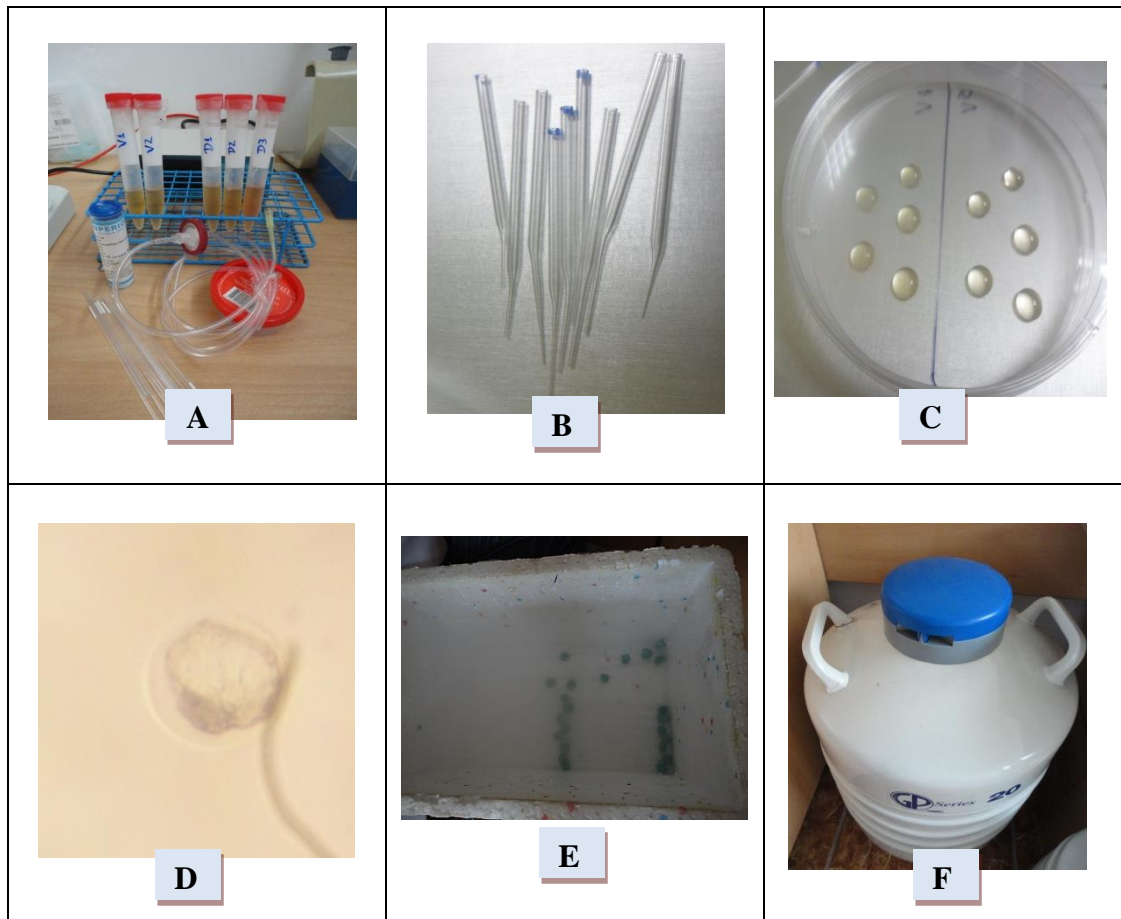
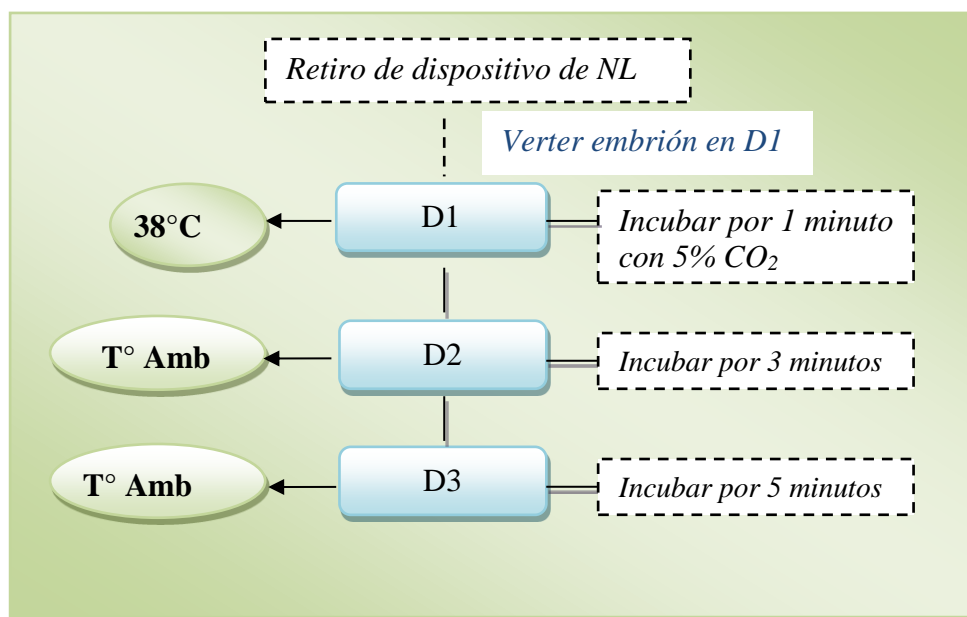


Figura N° 11: Vitrificación: a) materiales y medios para la vitrificación , b) dispositivos para el almacenamiento de los blastocistos, c) gotas de los medios de vitrificación, d) Blastocisto en medio de vitrificación , e) nitrógeno líquido, f) almacenamiento en el tanque criogénico a -196°C .

- *Desvitrificación*

Este proceso consistió en extraer las pajillas con el dispositivo del tranque de nitrógeno líquido, posteriormente se retiró el dispositivo de la pajilla plástica; para expeler el blastocisto y el medio del dispositivo se hizo uso la micropipeta de 10 ul., para posteriormente ser colocado en la solución de descongelación (D1 - Vitrogen®, Brasil) e incubado por 1 minuto a 38°C con 5% CO_2 , en una microgota de 60 ul, posteriormente se transfirieron los blastocistos a la solución de dilución (D2 - Vitrogen®, Brasil), la cual se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente, finalmente se transfirió al medio de lavado (D3 Vitrogen®, Brasil) a temperatura ambiente por 5 min. Los blastocistos recuperados se lavaron en medio de cultivo (IVC - Vitrogen®, Brasil), para finalmente ser re cultivados durante 3 horas

Figura N° 12 : Proceso de desvitrificación de blastocitos



3.5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones entre métodos se evaluaron mediante la prueba estadística de chi – cuadrado, los datos obtenidos fueron procesados en el programa SAS

3.6. VARIABLES EVALUADAS

- a. **Porcentaje de recuperación:** Se evaluó la cantidad de blastocitos congelados - vitrificados exitosamente y recuperados luego de descongelados.

- b. **Porcentaje de re – expansión:** Para la evaluación de la re – expansión se incubaron los embriones en el medio IVC (Vitrogen®, Brasil) a 38°C con 5% CO2 durante 3 horas, la evaluación de la tasa de re expansión fue de manera subjetiva, observando que el blastocito recupere su forma normal, y se rehidrate, además de ciertas características morfológicas (integridad de masa celular interna, integridad de la zona pelúcida, citoplasma homogéneo, y sin signos generales de picnosis). Se consideró realizar la evaluación de re-expansión de los blastocitos para relacionarla con la sobrevivencia de los mismos, pues al mantenerse viables los embriones mantienen la capacidad de osmosis, pasaje y consumo de nutrientes del medio en las que se cultivan al tener cierta fracción de células vivas (Mucci *et al.*, 2006), luego de que son sometidos al proceso de descongelación y extracción de crioprotectores.

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: El porcentaje de recuperación y re- expansión de los blastocistos sometidos a congelación es diferente a los de vitrificación debido a la facilidad de manejo del dispositivo y la cantidad de crioprotectores usados.

Ho: El porcentaje de recuperación y re- expansión de los blastocistos sometidos a congelación es igual a los de vitrificación debido a la facilidad de manejo del dispositivo y la cantidad de crioprotectores usados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tasa de división y Producción de blastocistos

N° Corrida	N° ovocitos cultivados	N° Clivaje	Porcentaje (%) clivaje	N° Embriones	Porcentaje (%)embriones
1	29	15	52	5	33
2	56	41	73	12	29
3	59	36	61	11	31
4	42	29	69	7	24
5	45	33	73	17	52
6	44	29	66	10	34
7	34	22	65	7	32
8	35	21	60	9	43
9	70	48	69	23	48
TOTAL	414	274	66	101	37

Tabla N° 1: Eficiencia de la producción de blastocistos bovinos *in vitro*

Los resultados son menores a los obtenidos por Martins (2009), quien logró tasas de clivaje de 87.48, 87.22, 85.13, 85.73 por ciento, al realizar los experimentos suplementando los medios de cultivo con 2.5% SFB (suero fetal bovino), 0% SFB, 2.5% SFB + F, 0% SFB + F, respectivamente. Diferencias que probablemente se deban a que se trabajó con ovarios de vacas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus indicus* y *Bos taurus indicus* x *Bos taurus*, además de adicionar a los medios de cultivo forskolin (lipólisis química). Báez *et al* (2010), manifiestan que el ganado con predominancia fenotípica *Bos indicus* presenta mejores tasas de desarrollo embrionario debido a que sus ovocitos son más competentes al tener genes termo tolerantes, con capacidad para resistir las condiciones ambientales, y que pueden llegar a desarrollarse luego de la fecundación en mayor porcentaje de embriones que los del ganado *B. taurus*.

Rizos *et al.*, (2003) observaron una tasa de división superior, de 85 ± 4 y 84 ± 3 por ciento, que podría deberse a que sus medios de cultivo fueron suplementados con fluido de oviducto sintético (SOF) + 3 mg / ml de albumina sérica bovina (BSA) + suero fetal bovino 10% , SOF + 3 mg / ml de BSA, en ausencia de suero. Abdalla (2010) reporta una tasa de división mayor de 80 por ciento, que posiblemente se deba a que después de 6 horas de co-incubación de espermatozoides - ovocitos a $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 los presuntos cigotos se transfirieron al medio SOF, cultivado a $39.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 . Sanches *et al.* (2013) reportan 78.8 y 72.7 por ciento; superioridad probablemente debida a que se trabajo con ovarios de *Bos indicus* (Nellore).

Bernal (2016) obtuvo tasas de clivaje de 68.8 ± 4.1 , 70.9 ± 5.9 , al suplementar el medio de maduración con $100\text{ }\mu\text{m}$ de cisteamina y $50\text{ }\mu\text{m}$ de cisteamina respectivamente de cultivo con cisteamina. Teixeira (2010), reportó tasas de clivaje inferiores, de 46.0, 51.2, 49.8 y 51.9 por ciento, al realizar el cultivo de ovocitos con medios suplementados con suero, medio con suero + ácido linoléico conjugado (CLA), medio sin suero y medio sin suero más CLA, respectivamente. Según el autor el CLA puede afectar diferentes caminos metabólicos. Sandal y Özdaş (2015) obtuvieron tasas de clivaje de 47.9, 50.1, 52.2, 49.4 por ciento al suplementar al medio de maduración TCM 199: cisteamina + SOF, cisteamina + medio CR1 aa, medio SOF sin medio cisteamina , CR1 aa, en ausencia de cisteanima. Finalmente, Corallo (2008), reporta tasas de clivaje de 68,71 por ciento.

En la tabla N° 01 se muestra la tasa de división (clivaje) en la investigación. Se obtuvo como promedio una tasa de división de 66 por ciento, (Sirard *et al.*, 2006), mencionan que 80-90 por ciento de los ovocitos destinados a procesos de fecundación *in vitro*, son capaces de madurar, proseguir a su fecundación y comenzar a dividirse, al menos hasta el estadio de 2 a 4 células. Los resultados de la presente investigación posiblemente de deban a que el origen de los ovocitos era muy heterogéneo, no se conocía la edad cronológica e historial reproductivo de las hembras de donde se obtuvieron los ovarios y por consiguiente los ovocitos.

En cuanto refiere a la tasa de producción de blastocistos , se menciona que los ovocitos capaces de transformarse en blastocisto transferibles se encuentran entre 30 y 40 por ciento (Park *et al.*, 2005, Herradón *et al.*, 2007 y Gómez *et al.*, 2008); y los resultados de la presente investigación se encuentran dentro de este rango. Sanches *et al.*(2013), reportan tasas de

45.3 y 39.9 por ciento, algo superiores a las del presente estudio, al añadir o no forskolin al medio de cultivo; y, Teixeira(2010), tasas inferiores de 24.2, 24.2, 16.6 y 15.0, al realizar la el cultivo de los ovocitos con medios suplementados con suero, medio con suero + ácido linoléico conjugado (CLA), medio sin suero y medio sin suero más CLA, respectivamente; similares a las de Adballa (2010), de 29 y 11 por ciento de blastocistos expandidos, en los Días 7 y 8, respectivamente.

En la presente investigación se obtuvo un valor de 37 por ciento, semejante o superior en algunos casos a los reportados en la literatura; aun cuando es importante resaltar que los embriones procedentes de ovocitos de matadero, logran en general tasas de supervivencia inferiores a las de embriones producidos *in vivo* (Lonergan y Fair, 2006); y que solo un tercio de los ovocitos madurados *in vitro* se desarrollan a la etapa de mórula o blastocisto. Siendo necesario reiterar que la eficiencia de la producción de embriones *in vitro* está ligada no solo al sistema de cultivo, sino también a la calidad intrínseca de los ovocitos (Rizos *et al.*, 2008). Los resultados encontrados podrían deberse a que se desconoce de la condición y nivel nutricional de las vacas donadoras, además de su estado fisiológico y etario.

4.2. Tasa de recuperación de blastocistos

Luego de concluir el proceso de descongelación y desvitrificación se logró recuperar 48 (92.31 por ciento) de blastocistos, por el método de congelación lenta o convencional, puesto que se usaron pajillas de 0.25 ml, que facilitan la recuperación de los embriones; en tanto que por la vitrificación, se presentaron mayores pérdidas de embriones, debido a que los blastocistos se encontraron almacenadas en dispositivos cuyo volumen de almacenamiento era muy bajo (2 μ l); además, los dispositivos fueron elaborados a partir de micro tubos de vidrio, los cuales fueron sometidos a calor con consecuente reducción de su diámetro generándose, en ocasiones, rupturas de las mismas al intentar recuperar el embrión, es así que se logró recuperar 38 (77.55 %) embriones (Tabla N° 2)

Tabla N° 2 : Tasa de recuperación de blastocitos bovinos *in vitro*

Método de criopreservación	N° Criopreservados	Embriones	Tasa de recuperación (%)	Valor X²	P-Valor
Congelación	52		48 (92.31) ^a	4.3442	0.0371
Vitrificación	49		38 (77.55) ^b		

En las comparaciones verticales, letras diferentes indican que existe diferencia estadística significativa ($p < 0,05$).

La tasa de recuperación de embriones entre los métodos: congelación lenta o convencional y vitrificación fue diferente ($p < 0,05$) en favor de la congelación lenta. Diferencia que posiblemente se deba a la facilidad de manejo de los elementos empleados (pajillas y dispositivos elaborados) para este fin.

Al vitrificar embriones haciendo uso de los dispositivos OPS y CPS, Yu *et al.*, 2010, obtuvo tasas de recuperación de $85,4 \pm 4,9\%$ frente a $87,9 \pm 5,2\%$; respectivamente, algo superiores a las encontradas en el presente estudio.

4.3. Tasa de re expansión de los blastocistos

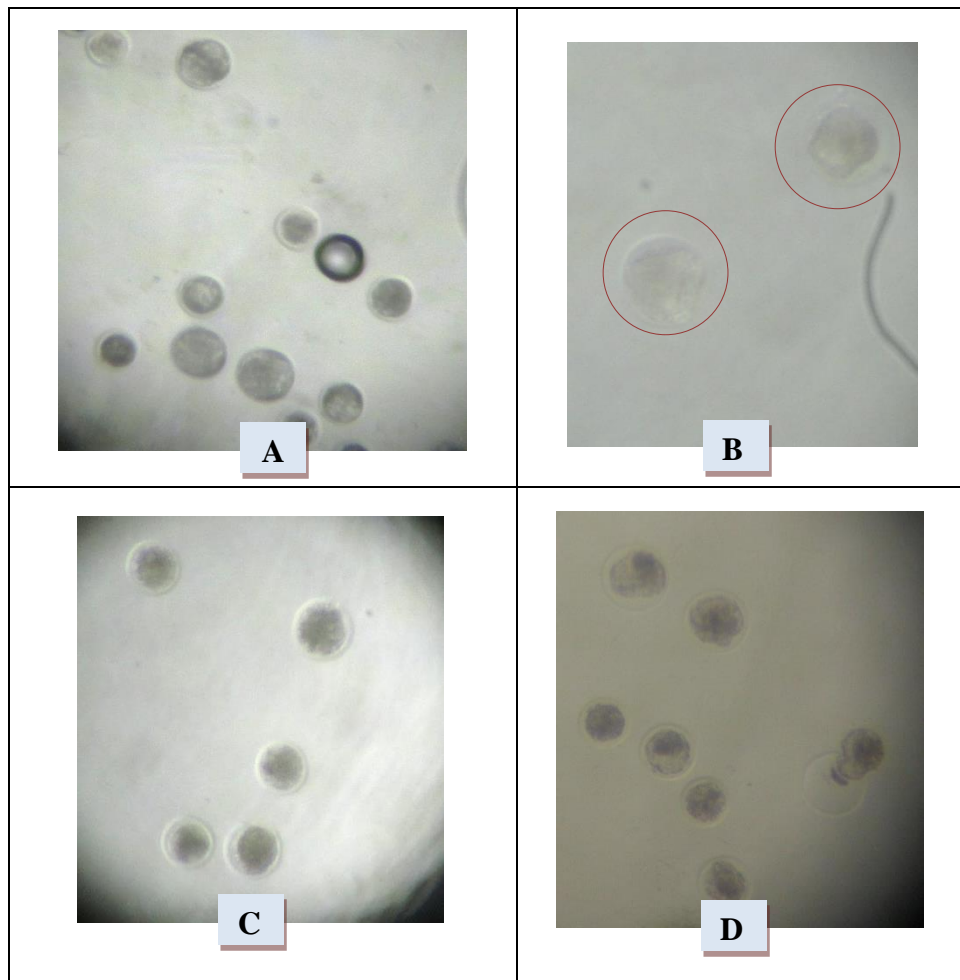


Figura N° 13: Re expansión de blastocistos bovinos a) embriones, b) embriones en medio de desvitrificación, c) y d) embriones re expandidos

Se logró obtener una tasa de re expansión de 43.75 por ciento (21 embriones) en la congelación lenta o convencional, y 26.32 por ciento (10 embriones) en la vitrificación (Tabla N° 3), no encontrándose diferencias ($p > 0,05$). entre ambos métodos de criopreservación, tal vez por el pequeño tamaño de muestra.

Tabla N° 3 : Tasa de re expansión post criopreservación de blastocistos bovinos *in vitro*

Método de criopreservación	N° Embriones cultivados	Re-expandidos en cultivo <i>in vitro</i> a 3h (%)	Valor X²	P-Valor
Congelación	48	21 (43.75) ^a	2.7964	0.0945
Vitrificación	38	10 (26.32) ^a		

En las comparaciones verticales, letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

Larocca *et al.*, (1998), al congelar blastocitos de excelente calidad en sus diferentes estadios, el día 7 post-fecundación *in vitro*, -utilizando como crioprotector etilenglicol (EG) 1,5 M en fosfato buffer salino modificado (PBS) suplementado con sacarosa 0,1 M y albúmina\ácido linoléico (40 mg\ml)-, obtuvo tasas de re expansión y desarrollo de 20por ciento para blastocisto temprano , 78.1 por ciento para blastocisto y 44.4 por ciento para blastocisto expandido, al re cultivarlos en medio TCM 199 suplementado con 10 mM de β -mercaptoetanol (β -ME) y 10 por ciento de suero fetal bovino (SFB); mientras que al re cultivarlos en medio CR1aa, suplementado con 10 mM de (β -ME) y 10 por ciento de (SFB), alcanzó un 75, 57.1y 40por ciento para blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto ¿tardío?, respectivamente. Estos resultados son relativamente mayores a los hallados en el presente trabajo debido a que se utilizó otro medio de congelación y re cultivo, además que el tiempo de evaluación fue a las 24 horas.

Sin embargo, Assumpção *et al* (2008), reportan tasas de re- expansión inferiores de 41.53 ± 6.67 y 36.99 ± 5.27 al criopreservar embriones por congelación lenta. Resultados que se podrían deberse a que utilizó velocidades de enfriamiento diferentes a las del presente estudio ($0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Las velocidades empleadas fueron de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $1.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$., respectivamente.

Inaba *et al.* (2011), obtuvo tasas de re- expansión, a las 24 horas, de 88.6 por ciento. Esta evidente superioridad se debe a que utilizó un medio diferente (1,5 M de EG, 0,1 M de SUC y 4 mg / ml de BSA); además que las pajuelas se mantuvieron a $-7,0^{\circ}\text{C}$ por 15 min, se enfrió hasta -30°C a una velocidad de $-0,3^{\circ}\text{C} / \text{min}$ y luego se sumergió a nitrógeno líquido.

Corallo (2008), obtuvo tasas de 58,58 por ciento de re-expansión en la congelación controlada y de 13,65 por ciento en la vitrificación, debido posiblemente a que los embriones fueron re cultivados en medio TCM199, suplementado con suero fetal bovino. En un segundo experimento, sin suplemento de suero fetal bovino, obtuvo tasas de re-expansión de 34,66 por ciento en la congelación controlada y de 19,62 por ciento en la vitrificación, similares a las halladas en el presente estudio.

Abdalla *et al.*, 2010, obtuvo tasas de re expansión (supervivencia) de los blastocistos IVF de (84 a 89%), a las 24 horas, las cuales no se vieron afectadas por el grado de desarrollo o edad del embrión (día 7 y 8). Valores superiores a los obtenidos probablemente porque se usó un protocolo de vitrificación diferente (7,5% etilenglicol y 7,5% dimetilsulfóxido (DMSO) en TCM-199/20% FBS -suero fetal bovino- como medio base; durante 3 min a temperatura ambiente, luego fue trasladado la otra solución de 15% de EG, 15% de DMSO, y 0,5 M de sacarosa en el medio de base por 40 s a temperatura ambiente). Además, los embriones fueron cargados en los dispositivos Cryotop. El medio de re cultivo de los embriones fue SOF.

Saha *et al.*, 1996, logró tasas de re expansión de 86, 72 y 46 por ciento, al re cultivar embriones de 7, 8 y 9 días, respectivamente; resultados que podrían deberse a que la evaluación de la sobrevivencia, asociada a la re expansión, se realizó de manera objetiva mediante tinción diferencial (recuento de células vivas y muertas) de fluorocromo, además de hacer uso de un dispositivo diferente (pajillas de 0.25 ml). La inferioridad de nuestros resultados se debe posiblemente a que la evaluación se realizó de manera subjetiva.

Tshimangadzo *et al.*; 2004, tras cultivar embriones en medio optimizado de potasio simple (KSOM) y KSOM+SOF (Fluido de oviducto sintentico) , y vitrificar embriones con diferentes horas de mantenerse cultivadas (144, 156 y 180 horas), obtuvo tasas de re expansión a las 6 horas de 68 ± 5 , 52 ± 4 y 49 ± 5 , respectivamente, en embriones cultivados en KSOM, y de 68 ± 5 , 87 ± 4 y 52 ± 5 , en embriones cultivados en medio KSOM+SOF; resultados que, en general, son mayores a los del presente estudio, probablemente debido a que los embriones fueron cultivados en medios enriquecidos diferentes.

Teixeira, 2010, reportó tasas de re expansión de 68.6, 77.5, 75.7 y 71.8 por ciento post desvitrificación, superioridad que puede deberse al cultivo de los ovocitos, con medios suplementados con suero, medio con suero + ácido linoléico, conjugado (CLA), medio sin suero y medio sin suero más CLA, respectivamente. Según Baumgard *et al.* (2002), el CLA puede reducir la acumulación de lípidos mediante la reducción de los niveles de ARN mensajero (ARNm) de enzimas lipogénicas, mejorando la viabilidad de los embriones. Por ejemplo, Yu *et al.*, (2010), obtuvo tasas de supervivencia de $56,3 \pm 4,4$ y $58,0 \pm 6,8$ por ciento, al vitrificar embriones en dispositivos CPS y OPS, respectivamente, y en la congelación convencional de $46,9 \pm 3,7$ por ciento;

Izaguirre (2012), al realizar la vitrificación de embriones en dispositivos *Fibreplug*, alcanzó tasas de re expansión de $65,08 \pm 7,8$ por ciento, a las 2 horas post cultivo. Diferencias podrían deberse a que se usó un dispositivo adicional, que consistió en un gancho sobre el cual se depositó la gota del medio de vitrificación conteniendo el embrión; además de una pajuela de 0,25 mL, cargada con una columna de 7 mm de medio de calentamiento (TCM 199 Hepes, 20 por ciento de FCS y sucrosa 0,25 M), seguida de 1 cm de aire y una última columna de 6 cm de medio de calentamiento.

Díez (2010), obtuvo porcentajes de re-expansión de 54,08 por ciento, a las 48 horas post-calentamiento; posiblemente estos resultados se deban a que en la investigación se usaron los dispositivos cryotip (23.000 °C/minuto). Isachenko *et al.* (2005) recomienda tasas altas de congelamiento ($> 23,000$ ° C) y una solución minimizada (0.1 μ L) alrededor de del embrión para lograr altas tasas de sobrevivencia embrionaria.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio son superiores a $23,15 \pm 6,67$ por ciento, hallado por Assumpção *et al.* (2008) en vacunos, con re-expansión a 24 horas; empleando un sistema clásico de vitrificación con pajuelas de 0,25ml, y una velocidad de enfriamiento de 2000°C/min (Vajta *et al.*, 1998). Sin embargo, Asgari (2009) reportó en bovinos, a 48 h de cultivo, un valor superior de 78,50 por ciento de supervivencia y una eclosión de 43,7 por ciento, con Cryotip; y, por último, Banti (2014) igualmente reporta en embriones humanos vitrificados tasas de sobrevivencia de 67,30 por ciento en Cryotip y de 87.00 por ciento en Rapid-i..

Como ya se ha referido, el uso de suero fetal bovino en los medios de cultivo genera embriones con mayor cantidad de lípidos en el citoplasma. ; asimismo, los embriones con mayor cantidad de lípidos son menos resistentes a la criopreservación (Rizos *et al.*, 2002; Bernard Lonergan *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2003; Seidel *et al.*, 2006). Dado que en la presente investigación los embriones fueron cultivados en medios comerciales, que evidencian la presencia de suero fetal bovino, es probable que las menores tasas de re-expansion (sobrevivencia) encontradas después de la congelación y vitrificación, se deba a la elevada cantidad de lípidos que pudieran contener.

En resumen, las tasas de sobrevivencia de los embriones producidos *in vitro* son variables (Kaidi *et al.*, 2001) y más bajas que las obtenidas en embriones producidos *in vivo* (Alvarenga *et al.*, 2007, Dinnyes y Nedambale, 2009). Esto se debe probablemente a las características físicas que hacen que los embriones producidos *in vitro* sean más sensibles cuando están expuesto a bajas temperaturas (Vajta *et al.*, 1996;, 2009); entre estas características se tienen: i) el aumento del número de vacuolas (Shamsuddin *et al.*, 1992); ii) aumento de la fragilidad de la zona pelúcida (Dobrinsky *et al.*, 1991); iii) el número de blastómeros (Rizos *et al.*, 2002); iv) mayor incidencia de apoptosis; y, v) aumento en el contenido citoplásmico de lípidos (Massip *et al.*, 1995). Por estas razones, y especialmente la última, la criopreservación de embriones producidos *in vitro* reduce en gran medida la posibilidad de sobrevivencia (Pereira y Marques, 2008).

V. CONCLUSIONES

- El método de criopreservación de congelación lenta o controlada, de blastocitos producidos *in vitro*, mostró mejores tasas de recuperación post descongelación que el método de vitrificación, debido a la facilidad de recuperación de blastocitos de las pajuelas de 0.25 cc.
- Las tasas de re-expansión de los blastocitos producidos *in vitro*, criopreservados por los métodos de congelación lenta o convencional y de vitrificación fueron similares; sin embargo, ambos produjeron daños estructurales a los blastocitos, reduciendo su sobrevivencia.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la evaluación de la sobrevivencia embrionaria post descongelación de los diferentes métodos de criopreservación, de manera objetiva, haciendo uso de tinción diferencial para el conteo de células vivas y muertas;
- Realizar nuevas investigaciones utilizando diversos medios de re cultivo;
- Realizar la evaluación de la tasa de re expansión o viabilidad de los embriones, sometiéndolos a diferentes tiempos de recultivo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL RAZEK I.M.; CHARPIGNY G.; KODJA, S. 2000. Differences in lipid composition between *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 53, p. 346.

ABDALLA M.; SHIMODA H.; HARA H.; MORITA M.; KUWAYAMA M.; HIRABAYASHI S.; HOCHI. 2010. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. Japan

ABE H.; YAMASHITA S.; SATOH T. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 57-66.

ABE H.; YAMASHITA S.; ITOH T. 1999. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and-fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, v.53, p. 325–335.

ABÓN ESCALONA L. 2012. Calentamiento en paso único de embriones bovinos producidos *in vitro* y vitrificados. Universidad de Oviedo Master Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción.

AGCA Y.; MONSON R.L.; NORTHEY D.L.; SCHAEFER D.M.; RUTLEDGE J. J. 1996. Postthaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, p.175.

AHUJA C.; Col. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Trop.*, 27(3): 277-284.

ALVARENGA M.A.; FERNANDES C.B.; LANDIM-ALVARENGA F.C. 2007. Criopreservation of equine embryos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35(Supl 3), p. 799-809.

AMANN R.P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J. Androl*; 2(10), 89-98.

ANZAR M.; HASSAN M.M.; GRAHAM E.F.; DEYO R.C.M.; SINGH G.; 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*. 2 (36), 307-317.

ARAV A. 1992. Vitrification of oocytes and embryos In: LAURIA, A., GANDOLFI, F., *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. Port Press, London and Chapel Hill; 22: 255-264.

ARNOLD K.; PRATSCH L.; GAWRISH K. 1983. Effect of poly (ethylene glycol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.782, p.121-128.

ASGARI B.V.; MOHSEN F.; MORTEZA H.S.; 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.

ASSUMPCÃO M.E.; HAIPECK O. D.; LIMA, K. A. 2002. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, vol.39, n.3, p.149-156. ISSN 1413-9596.

ASSUMPCÃO M.E.; MILAZZOTTO M.P.; SIMÕES R.; NICACIO A.C.; MENDES C.M.; MELLO M.R.; VISINTIN J.A. 2008. *In vitro* survival of *in vitro*-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Animal. Reproduction*; 5(3/4):116-120.

ÁVILA P.; MADERO J.; LÓPEZ C.; LEÓN M.; ACOSTA L.; GÓMEZ C.; DELGADO L.; GÓMEZ C.; LOZANO J; REGUERO M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obst. Ginec.*, 57(4): 291-300.

BÁEZ F.J.; ADEYMI C.; HERNÁNDEZ H.; VILLAMEDIANA P. 2010. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus* Revista Científica, FCV-LUZ Vol. XX, N° 3, 259-267.

BANTIM. 2014. Comparison of recovery, survival and clinical pregnancy rate between two different closed vitrification devices (Rapid-i versus Cryotip). Embryology Department, London Fertility Centre.

BAUMGARD L.H.; MATITASHVILI E.; CORL B.A. 2002. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2155.

BERNAL B H. 2016. Influencia de la suplementación del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *in vitro*. Universidad de Córdoba.

BLONDIN P.; BOUSQUET D.; TWAGIRAMUNGU H.; BARNES F.; SIRARD MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 66:38-43.

BOUSQUET D.; TWAGIRAMUNGU H.; MORIN N.; BRISSON C.; CARBONEAU G.; DUROCHER J. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v. 51, p. 59-70.

CELESTINOS M.; GATICA M. 2002. Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch. Med. Vet.*, 34(2): 157-165.

CHANDOLIA R. K.; PELTIER M. R.; TIAN W.; HANSEN P. J. 1999. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 6, p. 1644-1648.

CHO SK.; CHO SG.; BAE IH.; PARK CS.; KONG K. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci*; 73: 151-158.

CORALLO NICACIO ALESSANDRA. 2008. Avaliação do desenvolvimento após a Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Programa de Postgrado en Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo.

CREMADES N.; SOUSA M.; SILVA J.; VIANA P.; SOUSA S.; OLIVEIRA C.; TEIXEIRA DA SILVA J.; BARROS A. 2004. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. Hum Reprod; 19: 300- 305.

CUELLO C.; SÁNCHEZ J.; ALMIÑANA C.; GIL MA.; PERALS ML.; LUCAS X.; ROCA J.; VÁZQUEZ JM.; MARTÍNEZ EA. 2008. Effect of the cryoprotectant concentration on the *in vitro* embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. Criobiology; 56: 189-194.

DÍEZ C.; MUÑOZ M.; CAAMAÑO N.; GÓMEZ E. 2010. Biotecnologías reproductivas: Producción y criopreservación de embriones *in vitro*. Tecnología Agroalimentaria; 8:41 – 46.

DINNYES A.; NEDAMBALE T.L. 2009. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. Reproduction, Fertility and Development, v. 21 p. 45–59.

DOBRINSKY J. R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. Theriogenology, v. 57, n. 1, p. 285-302.

DOBRINSKY J.R.; HESS F.F.; DUBY R.T.; JROBL J.R. 1991. Cryopreservation of bovine embryos by vitrification. Theriogenology. 37:202(Abstract).

FAHNING M.; GARCÍA M. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. Cryobiology, 29, 1-18.

FAHY G.M.; RALL W.F. 1985. Vitrification: A new approach to embryo cryopreservation Theriogenology; 23, (1): 220.

FAIR T.; LONERGAN P.; DINNYES A.; COTTELL D.C.; HYTTEL P.; WARD F. A.; BOLAND M. P. 2001. Ultra structure of bovine blastocysts following cryopreservation; effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, n.2, p. 186-195.

GALLI C.; CROTTI G.; NOTARI C.; TURINI P.; DUCHI R.; LAZZARI G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55: 1341-1357.

GARCÍA M.I.; CHÁVEZ A.; MEDINA J.; MONTOYA J.E.; QUIROZ E.; MARTÍNEZ R.; RUVALCABA LA. 2008. Vitrification in cryotop is a higher efficient technique for the criopreservation of human oocytes. *Congreso Mexicano de Oncología*

GARDNER, D. K.; PAWELCZYNSKI M.; TROUNSON A. O. 1996. Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 44: 472-475.

GIBBONS J. R.; BEAL W.E.; KRISHER R.L.; FABER E.G.; PEARSON R.E.; GWAZDAUSKAS F.C. 1994. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, v.42, p.405-419.

GOMES E.; DIEZ C. 2000. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 23-37.

GÓMEZ E.; MUÑOZ M.; RODRÍGUEZ A.; CAAMANO J.N.; FACAL N.; DIEZ C. 2009. Vitrification of Bovine Blastocysts Produced *In vitro* Inflicts Selective Damage to the Inner Cell Mass. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(2):194-199

GOMEZ E.; RODRIGUEZ A.; MUÑOZ M.; CAAMANO J.N.; HIDALGO C.O.; MORAN E.; FACAL N.; DIEZ C. 2008. Serum free embryo culture médium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69:1013-1021.

GONÇALVES P.B.D.; BARRETA M.H.; SANDRI L.R.; FERREIRA R.; ANTONIAZZI A.Q. 2007. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.31, p.212-217.

GONÇALVES P.B.D.; FIGUEIREDO J.R.; FREITAS V.J.F. 2002. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo; 340p.

GORDON I. R. 2003. Culturing and evaluating the early bovine embryo. In Laboratory production of cattle embryos. CAB International Cambridge. 238-243.

GORDON I; LU H. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. Theriogenology; 33: p77-87.

GORDON, I. 2006. Tecnología de la Reproducción de los animales de granja. Traducido por: David George. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 441 p.

GRAHAM J.K.; MOCÉ E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology, v.64, p.492-504.

GRAVANCE C.G.; VISHWANATH R.; PITT C.; GARNER D.L.; CASEY P.J. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. Journal of Andrology 19, 704-709.

GUIGNOT F. 2005. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. INRA Prod. Anim, 18, 27-35

GUTIÉRREZ A.; GRANADOS J.; PINTADO B.; DE LA FUENTE J. 2001. Influence of the glucose on the sex ratio of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro*. Reprod. Fertil. & Develop. 13, 361-365.

HAMANO S.; KOIKEDA S.; KUWAYAMA M.; NAGAI T. 1992. Full-term development of *in vitro* matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. Theriogenology, v.38, p.1085-1090.

HASLER J.F. 2000. *In vitro* production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. Human Reproduction; v.15, p.47–58.

HASLER J.F.; HURTGEN P.J.; JIN Z.Q.; STOKES J.E. 1997. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. Theriogenology, v.48, p.563-579.

HASLER, J. F. 1998. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. Journal of Animal Science. 76: 52-74.

HASLER, JF. 2010. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. Reprod, Fertil and Dev.; 22: 119-125

HERRADÓN P.G.; QUINTELA L.A.; BECERRA J.J.; RUIBAL S.; FERNÁNDEZ M. 2007. *In vitro* fertilization: An alternative for genetic improvement in bovines. Arch. Latino am. Prod. Anim. Vol. 15.

HOLM P.; BOOTH P.J.; SCHMIDT M.H.; GREVE T.; CALLESEN, H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOF medium supplemented with sodium citrate and myoinositol with or without serum-proteins. Theriogenology, v. 52, p. 683–700.

HOSHI H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology, v. 59, n.2, p. 675-685.

HYTTEL P.; FAIR T.; CALLESEN H.; GREVE T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47:23-32.

INABA Y.; AIKAWA Y.; HIRAI T.; HASHIYADA Y.; YAMANOUCHI T.; MISUMI K.; OHTAKE M.; SOMFAI T.; KOBAYASHI S.; SAITO N.; MATOBA S.; KONISHI K.; IMAI K. 2011. In-straw Cryoprotectant Dilution for Bovine Embryos Vitrified Using Cryotop. Journal of Reproduction and Development, Vol. 57, No. 4.

ISACHENKO V.; MONTAG M.; ISACHENKO E. 2005. Aseptic technology of Vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Human Reproduction* 20, 492–496.

IZAGUIRRE FERNÁNDEZ ELSA. 2011. Adaptación de un método de vitrificación/calentamiento en fibreplug para la transferencia directa de blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción.

KAIDI S.; BERNARD S.; LAMBERT P.; MASSIP A.; DESSY F.; DONNAY I. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction*; 65: 1127-1134

KASAI M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *An. Repr. Sci.* 42(1-4):67-75.

KASAI M.; MUKAIDA T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed online*; 9: 164-170.

KIM CHI-GU.; YONG H.; LEE G.; CHO J. 2008. Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5% of PVP is beneficial for *in vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed mouse embryos. *Journal of Reproduction and Development*; v.54, p.250-253.

KIM JH.; FUNAHASHI H.; NIWA K.; OKUDA K. 1993. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 37:875-886.

KITAGAWA Y.; SUZUKI K.; YONEDA A.; WATANABE T. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, v. 62, p. 1186–1197.

KRAUSE, W. 1995. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Hum. Reprod.* 10, 60-66.

LANDIM E ALVARENGA, F.C. 1995. Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões eqüinos. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 102.

LANE M.; BAVISTER BD.; LYONS EA.; FOREST KT. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol*; 17: 1234-1236.

LAROCCA, C.; D. FILA S.; KMAID A.; FERNÁNDEZ I.; LAGO ; G. ROSES.1998. Viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro* congelados descongelados en dos medios de cultivo con β -mercaptoetano. *Arch. Zootec*. 47: 3-10.

LEIBFRIED L.; FIRST N. L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science*; v.48, p.76-86.

LEIBO S.; LOSKUTOFO F. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*; 39: 81- 94.

LEIBO S.P. 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*; v.69, p.37–47.

LEIBO S.P.; MAZUR P.; JACKOWSKI S.C. 1973. Factors affecting the survival of frozen thawed mouse embryos. *Cryobiology*; v.11, p.509.

LEONI G.; BOGLIOLO L.; BERLINGUER F.; ROSATI I.; PINTUS P.P.; LEDDA S.; NAITANA S. 2002. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on postthaw protein synthesis and viability of *in vitro* derived ovine embryos. *Cryobiology*, v. 45, n.3, p. 204-212.

LEVY R.R.; CORDONIER H.; CZYBA J.C. 2001. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. *Italian Journal Anatomy Embryology*, v. 106, n.2, p. 101-108.

LEWIS S.; STERLING E.; YOUNG I.; THOMPSON W. 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 67:142-147.

LIEBERMANN J.; NAWROTH F.; ISACHENKO V.; ISACHENKO E.; RAHIMI G.; TUCKER MJ. 2002. Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. Biol Reprod; 67: 1671-1680

LINDER G.M, Y WRIGHT R.W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20 (4): 407-416.

LONERGAN P.; FAIR T.; CORCORAN D.; EVANS A. C. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. Theriogenology, v. 65, p. 137-152.

LONERGAN P.; RIZOS D.; GUTIÉRREZ-ADÁN A.; MOREIRA P. M.; PINTADO B.; DE LA FUETE J. 2003. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. Biology of Reproduction, v. 69, n. 4, p. 1424-1431.

MACHADO G.M. 2009. Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção *in vitro* de embriões bovinos. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (UnB)/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília-DF, 67p.

MARQUANT-LEGUIENNE, HUMBLLOT P. 1998. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. Theriogenology, v. 49, n. p. 3-11.

MARTINO A.; SONGSASEN N.; LEIBO S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod., v.54, p.1059-1069.

MARTINS D. 2009. Vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* após lipólise química, Universidad de Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária y Zootecnia.

MASSIP A. 2003. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. Minireview. Reprod. Nutr. Dev.; 43: 325-330

MASSIP A.; MERMILLOD P.; DINNYES A. 1995. Morphology and biochemistry of invitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. Human Reproduction, v. 10, p. 3004–3011.

MAVRIDES A. Y MORROLL D. 2002. Cryopreservation of bovine oocytes: Is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete. Reprod. Nutr. Dev; 42: 73-80

MAZUR P. 2012. Roles of intracellular ice formation, vitrification of cell water, and recrystallization of intracellular ice on the survival of mouse embryos and oocytes. Cryobiology; 65: 339–366

MEZZALIRA A.; VIEIRA A.; BUSS CRUZ F.; BARBIERI D.; CARDOSO J. 1999. Vitriificação de ovócitos bovinos com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas. Acta Sci Vet.; 27: 262

MOCHIDA K.; OGURA A. 2010. Cryopreservation of embryos in laboratory species. Journal of Mammalian Ova Research, 27: 87–92.

MOHAN M.; RYDER S.; CLAYPOOL P.L.; GEISERT R.D.; MALAYER J. R. 2002. Analysis of gene expression in the bovine blastocyst produced *in vitro* using suppression subtractive hybridization. Biology of Reproduction, v. 67, n.2, p. 447-453.

MORRELL J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a Review. The Open Andrology Journal, 1, 1-9.

MORTIMER S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Human Reproduction. Update. 3(5): p403-439.

MORTIMER S. 2000. CASA practical aspects. J. Androl. 21, 515-524.

MOSQUERA J. 1994. Transferencia de embriones para la optimización reproductiva de la cría lechera. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Ecuador. s.p.

MUCCI N.; ALLER J.F.; KAISER G.; HOZBOR F.; ALBERIO R. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Archivo Médico Veterinario.

NAGAO Y.; SAEKI M.; HOSHI; KAINUMA H. 1994. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. Theriogenology, v. 41, p. 681-687.

NEDAMBALE T. L.; DINNYÉS A.; GROEN W.; DOBRINSKY J. R.; TIAN X.C.; YANG X. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. Theriogenology, v. 62, n. 3-4, p. 437-449.

NIEMANN H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. Theriogenology, v.35, p.109-124.

NIEMANN H; WRENZYCKI C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. Theriogenology, p. 53 v. 21–34.

PALASZ A.T., MAPLETOFT R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotechnology Advances, v.14, p.127-149.

PALMA G. 2001. Biotecnología de la Reproducción. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. p. 225-282.

PARK Y.S.; KIM S.S.; KIM J.M.; PARK H.D.; BYUN M.D. 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.

PARRISH J.; SUSKO-PARRISH J.; WINER MA.; FIRST NL. 1994. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod; 38:1171-80.

PEREIRA R.M.; MARQUES C.C. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell Tissue Bank, v. 9 p. 267-77.

PICKETT B.W. 1986. Principles of cryopreservation. In: techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings. Fort Collins.

PIETERSE M.C.; KAPPEN K.A.; KRUIP TH.; TAVERNE M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v. 30, n. 04, p. 751-762.

PUGH P. A.; TERVIT H. R.; NIEMANN H. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Animal Reproduction Science*, v. 58, n. 1, p. 9-22.

RIDDEL KP.; STRINGFELLOW DA.; GRAY BW.; RIDDEL JRMG. 1985. Effects of antibiotics on development capacity of bovine embryos. *Bov Pract.* 30:94.

RIEGER D.; LOSKUTOFF N.M.; BETTERIDGE K.J. 1992. The protective action of betaine on the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-culture *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 95:585-595.

RIZOS D.; CLEMENTE M.; BERMEJO-ÁLVAREZ P.; DE LA FUENTE J.; LONERGAN P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. 2008. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*; 44-50.

RIZOS D.; FAIR T.; PAPADOPOULOS S.; BOLAND M.P.; LONERGAN P. 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 62 p. 320-327.

RIZOS D.; GUITIERREZ-ADAN A.; PEREZ-GARNELO S.; DE LA FUENTE J.; BOLAND M.P.; LONERGAN P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v.68, p.236-243.

RODRIGUES J. L. 1992. Aspectos da congelação de embriões bovinos In: Reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões. , Jaboticabal. p.55-79, 1992.

RODRÍGUEZ MARTÍNEZ H, SARAVIA F, WALLGREN M ROCA J, PEÑA FJ. 2008. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology*; 1242–1250.

RORIE R.W.; LESTER T.D.; MILLER G.F.; GLIEDT D.W.; MCNEW R.W. 1994. Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenology*, v. 42, p. 385-95.

SAEKI K.; HOSHI M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE ML.; First NL. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod*; 44:256-260.

SAHA S.; OTOI T.; TAKAGI M.; BOEDIONO A.; SUMANTRI C.; SUZUKI. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trealose and polivinilpyrrolidone. *Cryobiology*, 33:291-9.

SAHA S.; RAJAMAHENDRAN R.; BOEDIONO A.; SUMANTRI C.; SUZUKI T. 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one step rehydration. *Theriogenology*; 46:331-43.

SANCHES B.V.; MARINHO L.S.R.; FILHO B.D.O .; PONTES J.H.F.; BASSO A.C .; MEIRINHOS M.L.G. SILVA-SANTOS K.C.; FERREIRA C.R.; SENEDA M.M. 2013. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before Vitrification. *Theriogenology* 80 372–377.

SANDAL A İ.; ÖZDAŞ Ö B. 2015. Vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos matured in modified TCM-199 medium. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 688 - 692

SEIDEL JR G. E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p. 228–235.

SEIDEL JR., G.E. 1986. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings.

SERRANO N.; SIERRA R.; SÁNCHEZ J.; RESTREPO L.; OLIVERA A. 2002. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*. Rev. Col. Ciencias Pecuarias, 15(3): 286-292.

SHAMSUDDIN M.; LARSSON B.; GUSTAFFSON H.; GUSTARI S.; BARTOLOME J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. 1992. Comparative morphological evaluation of *in vitro* and *in vitro* produced bovine embryos. International Congress on Animal Reproduction, v. 3, p. 1333-35.

SIRARD MA.; RICHARD F.; BLONDIN P.; ROBERT C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. Theriogenology; 65: 126-136.

TAKAHASHI Y.; FIRST N.L. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos; influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology 37:963-978.

TAYLOR U.; RATH D.; ZERBE H.; SCHUBERTH HJ. 2008. Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. Reprod Domest Anim; 43: 166-75.

TEIXEIRA DO ROSÁRIO RAHME LAILA SUCCAR. 2012. Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

TERVIT HR.; WHITTINGHAMDG; ROWSON LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. J Reprod Fert; 30:493-497.

TESFAYE D.; PONSUKSILI S.; WIMMERS K.; GILLES M.; SCHELLANDER K. 2003. Identification and quantification of differentially expressed transcripts *in vitro*-produced bovine preimplantation stage embryos. Molecular Reproduction and Development, v. 66, n. 2, p. 105-114.

THIBIER M. 2005. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction. Reproduction Nutrition Development; v.45, n.3, p.235-242.

THIBIER, M. 2004. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. International Embryo Transfer Society Newsletter, p.12-19.

THOMPSON J. G. 1997. Comparison between *in vitro*-derived and *in vitro*-produced preelongation embryos from domestic ruminants. Reproduction, Fertility and Development, v. 9, n. p. 341-354.

THOMPSON J. G.; MCNAUGHTON C.; GASPARRINI B.; MCGOWAN L.; TERVIT H.R. 2000. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. J Reprod Fertil 118: 47-55

TSHIMANGADZO L.; NEDAMBALE ANDRA´S; DINNYE´S; XIANGZHONG YANG; CINDY TIAN. 2004. Bovine Blastocyst Development *In vitro*: Timing, Sex, and Viability Following Vitrification. Biology of reproduction 71, 1671–1676.

URREGO R.; TARAZONA A.; OLIVERA M.; CAMARGO O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 21: p398-405.

VAJTA G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Animal Reproduction Science; 60: 357 – 364.

VAJTA G.; HOLM P.; GREVE T.; CALLESEN H. 1996. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. Animal Reproduction Science, v. 45, p. 191-200.

VAJTA G.; HOLM P.; KUWAYAMA M.; BOOTH P.J.; JACOBSEN H.; GREVE T.; CALLESEN H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev., v.51, p.53-58.

VAJTA G.; NAGY ZP. 2006. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory. Review on vitrification. Reproductive BioMedicine Online. 12: 779-796

VAN SOOM A.; YUAN Y. Q.; PEELMAN L. J.; DE MATOS D. G.; DEWULF J.; LAESENS H.; DE KRUIF. A. 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57: 1453-1465.

VERSTEGEN J.; IGUER-OUADA M.; ONCLIN K. 2002. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57, 149-179.

VIEIRA A.D.; RUBIN M.I.B.; LEHMKUHL R.C.; BARBIERI D.P.; MEZZALIRA A. 2008. Cryopreservation of immature bovine oocytes treated with Cytochalasin and vitrified in OPS. In: Annual Conference International Embryo Transfer Society.

VOLKEL SA, HU YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*; 37:23-37.

WHITTINGHAM D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J Reprod Fert (suppl)* 14:7-21.

WOODS E.J.; BENSON J.D.; AGCA Y.; CRITSER J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*; 48: 146-156.

WRATHALL, A.E. 1995. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, n.1, p.81-88.

XU J.; GUO Z.; SU L.; NEDAMBALE TL.; ZHANG J.; SCHENK J.; MORENO JF.; DINNYES JF.; JI W.; TIAN XC.; YAND X.; DU F. 2006. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *J Dairy Sci*; 89: 2510-2518.

YOUNG E.; KENNY A.; PUIGDOMENECH E.; VAN THILLO G.; TIVERON G.; PIAZZA, A. 1998. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. *Fertil. Steril. Suppl.*, 70:S16.

YU X.L.; DENG W.; LIU F.J.; LI Y.H.; LI X.X, ZHANG Y.L.; ZAN L.S. 2010. Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology* 73 (2010) 474–479

YUAN Y.Q.; VAN SOOM A.; COOPMAN F.O.J.; MINTIENS K.; BOERJAN M.L.; VAN ZEVEREN A.; DE KRUIF A.; PEELMAN L.J. 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v. 59, p. 1585–1596.

VIII. ANEXOS

Anexo N° 1: Prueba de Chi-Cuadrado de Asociación de método de criopreservación y recuperación

Obs	tratamiento	recuperacion	recuento
1	Congelacion	F	48
2	Congelacion	U	4
3	Vitrificacion	F	38
4	Vitrificacion	U	11

Donde:

- F = Recuperados
- U = No recuperados

Procedimiento FREQ

Frecuencia Porcentaje Pct fila	Tabla de tratamiento por recuperacion		
	tratamiento	recuperacion	
		F	U
Congelacion	48	4	52
	47.52	3.96	51.49
	92.31	7.69	
Vitrificacion	38	11	49
	37.62	10.89	48.51
	77.55	22.45	
Total	86	15	101
	85.15	14.85	100.00

Estadísticos para la tabla de tratamiento por recuperacion

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi-cuadrado	1	4.3442	0.0371
Chi-cuadrado de ratio de verosimilitud	1	4.4733	0.0344
Chi-cuadrado adj. de continuidad	1	3.2556	0.0712
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	4.3012	0.0381
Coeficiente Phi		0.2074	
Coeficiente de contingencia		0.2031	
V de Cramer		0.2074	

Test chi-cuadrado de Pearson	
Chi-cuadrado	4.3442
DF	1
Pr asintótico > ChiSq	0.0371
Exacto Pr >= ChiSq	0.0503

Anexo N° 2: Prueba de Chi-Cuadrado de Asociación de método de criopreservación y re-expansión.

Obs	tratamiento	re_expansion	recuento
1	Congelacion	F	21
2	Congelacion	U	27
3	Vitrificacion	F	10
4	Vitrificacion	U	28

Donde:

- F = Re - expandidos
- U = No re – expandieron

Procedimiento FREQ

Frecuencia Porcentaje Pct fila	Tabla de tratamiento por re_expansion		
	tratamiento	re_expansion	
		F	U
Congelacion	21	27	48
	24.42	31.40	55.81
	43.75	56.25	
Vitrificacion	10	28	38
	11.63	32.56	44.19
	26.32	73.68	
Total	31	55	86
	36.05	63.95	100.00

Estadísticos para la tabla de tratamiento por re_expansion

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi-cuadrado	1	2.7964	0.0945
Chi-cuadrado de ratio de verosimilitud	1	2.8423	0.0918
Chi-cuadrado adj. de continuidad	1	2.0913	0.1481
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	2.7639	0.0964
Coeficiente Phi		0.1803	
Coeficiente de contingencia		0.1775	
V de Cramer		0.1803	

Test chi-cuadrado de Pearson	
Chi-cuadrado	2.7964
DF	1
Pr asintótico > ChiSq	0.0945
Exacto Pr >= ChiSq	0.1162