



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

VIABILIDAD POST CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES
BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO Y VITRIFICADOS
MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE “OPEN PULLED STRAW” Y
CRYOTOP

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

FERNANDA MORALES PLIEGO

TUTOR: CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTORAL: LUCÍA RANGEL PORTA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

ARANTZATZU LASSALA IRUESTE

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

MEXICO, D.F. ABRIL 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Porqué sin ti no hubiera llegado ni a la mitad de este proyecto, gracias por acompañarme,
apoyarme e involucrarte tanto en lo que hago siempre. Gracias PACHA.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Gutiérrez, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por ser el mejor ejemplo a seguir, por su apoyo, confianza y motivación para empezar y terminar este proyecto.

A Lucy y Arantza, por ser mis tutoras y consejeras durante este proyecto.

Al Dr. Felipe Campos, por darme la confianza de trabajar en su laboratorio BIOGENETIC, recibirme en su casa, brindarme su apoyo y ofrecerme la oportunidad de profundizar mis conocimientos.

A Maritza y Maricela, por su amistad y toda su ayuda durante mi estancia en Comalcalco, Tabasco.

Al Dr. Joaquim Mansano por la oportunidad que me brindó para realizar una estancia en su laboratorio TECGENE, en Sao Jose do Rio Preto, Brasil, de la cual obtuve un gran aprendizaje.

A BRASUCA, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la ayuda invaluable para la obtención de los embriones usados para este trabajo.

Al Dr. Moisés, por su apoyo en la transportación de los embriones usados para este proyecto.

A Alina, por su amistad y ayuda en la producción *in vitro* de los embriones usados en este proyecto, el cual no hubiera podido ser terminado sin ella.

Al Dr. Juan Roa, por recibirme en una estancia en el CUCBA en Guadalajara y prestarme su laboratorio.

A Betty y Bethy, por su amistad y apoyo durante mi estancia en Guadalajara.

Al Dr. Jorge Ávila, al Dr. Fernando de la Torre, al Dr. Salvador Romo y al Dr. Javier Valencia por formar parte de mi jurado, sus excelentes correcciones y enseñanzas.

Al CONACYT por la beca otorgada durante el periodo de mi maestría.

Al Macroproyecto número 7 de la UNAM “Productividad sostenible en los hatos de cría en pastoreo” por brindarme el financiamiento para la realización de éste proyecto.

A todos los que durante mis estancias en los diferentes laboratorios ayudaron a ser de mi proyecto una gran aventura. Todos aquellos que me recibieron en su casa, me brindaron su amistad, me acompañaron en el laboratorio, me brindaron sus conocimientos y compartieron momentos especiales que hicieron posible terminar lo que empecé.

A mis papás, a los que debo todo en la vida, quienes nunca han dejado de creer en mí y motivarme para seguir adelante.

I. Resumen

1.1 Abstract

II. Introducción

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Técnicas de reproducción asistida

3.2 Congelación convencional y vitrificación

3.2.1 Velocidad de enfriamiento

3.2.2 Crioprotectores

3.2.2.1 Etilenglicol

3.2.2.2 Propanodiol

3.2.2.3 Azúcares

3.2.2.4 Polímeros

3.3 Daños celulares

3.4 Soportes de vitrificación

3.4.1 OPS

3.4.2 Cryotop

3.5 Evaluación embrionaria

3.5.1 Evaluación del daño en el DNA

3.5.2 Evaluación total de células

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

4.2 Hipótesis

V. Material y Métodos

5.1 Producción y cultivo de embriones *in vitro*

5.1.1 Recolección y selección de ovocitos

5.1.2 Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)

5.1.3 Fertilización *in vitro* (FIV)

5.1.4 Cultivo de embriones

5.2 Criopreservación

5.3 Diseño experimental

5.4 Evaluación de daño celular post-criopreservación

5.4.1 Desvitrificación

5.4.2 Marcaje para evaluar células con daños en ADN dentro del embrión

5.4.3 Marcaje para evaluar la cantidad de células totales dentro de un embrión

5.4.4 Montaje de embriones y observación al microscopio

5.5 Análisis estadístico

VI. Resultados

6.1 Vitrificación de embriones producidos *in vitro*

6.2 Desvitrificación de embriones producidos *in vitro*

6.3 Conteo celular y viabilidad embrionaria

VII. Discusión

VIII. Conclusiones

IX. Referencias

I. RESUMEN

En este estudio se vitrificaron embriones bovinos producidos *in vitro* con el fin de comparar el Open Pulled Straw (OPS) y el cryotop como soportes. Para la producción de los embriones, se obtuvieron ovarios de rastro y los ovocitos aspirados de los folículos antrales fueron madurados y fertilizados *in vitro* para después ser cultivados hasta el día 8 de desarrollo. Los embriones resultantes fueron divididos en tres grupos: 1. embriones vitrificados mediante OPS, 2. embriones vitrificados en cryotop reciclados y 3. embriones frescos. La muerte o daño celular se evaluó mediante el marcaje vital con TUNEL en cada embrión, el día 8 post-fertilización en embriones frescos y después de la desvitrificación en los grupos vitrificados. Igualmente, se hizo un conteo de número de células totales con la tinción para ADN Hoechst. Los embriones fueron evaluados mediante la relación del porcentaje de células positivas a TUNEL en relación con las células totales por embrión (Hoechst). Este porcentaje, es significativamente más alto (86%) en embriones vitrificados mediante el método del cryotop, obteniendo una tasa de muerte celular de 22%, mientras que la del método OPS fue de 41% y la de los embriones frescos fue de 8% ($P < 0.001$). En contraparte, en el sistema de vitrificación OPS, la adhesión del embrión al soporte fue más estable al no ser reusados, lo que resultó en un menor porcentaje de pérdida de embriones en el tanque de congelación al compararlo con el cryotop (16% vs 49%; $P < 0.001$). El número de células promedio por embrión fue de 59 y no cambió entre embriones vitrificados y frescos o tipo de soporte empleado. Estos hallazgos sugieren que el cryotop es un soporte más efectivo que el OPS al resultar en menor daño celular en embriones bovinos post criopreservación.

Palabras clave: bovino, embriones, criopreservación, vitrificación, daño celular, TUNEL, Hoechst.

1.1.ABSTRACT

In this study, *in vitro*-produced bovine embryos were vitrified using the Open Pulled Straw (OPS) and the Cryotop as carrier devices. Bovine ovaries were collected from a slaughterhouse; antral follicles were aspirated to obtain oocytes which were *in vitro* matured, fertilized and cultured until day 8 of development. The resultant embryos were divided in three groups: 1. Embryos vitrified using OPS, 2. Embryos vitrified in reused cryotop device and 3. Fresh embryos. Cellular damage was assessed on day 8 post- fertilization in fresh embryos and after thawing on vitrified ones with TUNEL vital stain. In addition, a total cell count per embryo was performed employing Hoechst DNA stain. Embryo evaluation was performed considering the ratio between TUNEL positive cells and the total cell number per embryo (Hoechst). The results showed this ratio was significantly higher (86%) in cryotop vitrified embryos, which showed 22% of cellular death, while embryos vitrified in OPS presented 41% of cell death and fresh embryos only 8% ($P < 0.001$). In counterpart, embryo adhesion to the OPS carrier device was more stable as no reused material was used, this resulted into less embryo loss for OPS vs. cryotop embryos in the liquid nitrogen tank (16% vs. 49%; $P < 0.001$). The average total cell number per embryo was 59, and did not differ between treatment groups. These findings suggest that the cryotop is a more effective carrier device, which results in lower cellular damage after cryopreservation.

Key words: bovine, embryos, cryopreservation, vitrification, cellular damage, TUNEL, Hoechst.

II. INTRODUCCIÓN

La selección genética para mejorar características reproductivas se realiza desde los principios de la domesticación animal (Basrur y King, 2005). Sin embargo, no fue sino hasta el siglo XX (Galli y Lazzari, 2005) cuando se empezaron a emplear técnicas más complejas para mejorar a la reproducción, denominadas “Técnicas de Reproducción Asistida” o ARTS por sus siglas en inglés. Estas tecnologías van desde la inseminación artificial y la criopreservación, hasta técnicas *in vitro* como la producción de embriones, la clonación o la transgénesis, y tienen como objetivo principal, incrementar la capacidad de reproducción de las hembras de alto mérito genético, diseminar características deseables, incrementar la fertilidad y reducir el intervalo generacional (Basrur y King 2005; Mapletoft y Hasler, 2005; Moore y Thatcher, 2006).

En las últimas décadas, las vacas han sufrido un decremento en su tasa de fertilidad (Lucy, 2001; Moore y Thatcher 2006; Sartori, Bastos y Wiltbank, 2010), ya que la alta demanda de nutrientes debida a la alta producción de leche, impacta negativamente múltiples factores fisiológicos, que repercuten en el establecimiento de una gestación (Walsh, Williams y Evans 2011). Debido a esto, hoy en día los productores tiene que apoyarse aún más en las ARTS para lograr un aumento en la eficiencia reproductiva y con esto aumentar la producción de leche, carne y piel (Basrur y King 2005; Galli y Lazzari, 2005). Actualmente, gracias a las ARTS, es común que el número de embriones obtenidos supere al número de hembras receptoras disponibles (Mapletoft y Hasler, 2005). Según reportes de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2012), los embriones producidos por superovulaciones en ganado lechero al año son cerca de 500,000 y de acuerdo a Galli y Lazzari (2008) aproximadamente el 15% de esos embriones son producidos por fertilización *in vitro* (IVF). Debido a la producción en exceso de embriones, fue necesario el desarrollo de tecnologías que permitieran la conservación de los mismos hasta tener a las hembras receptoras necesarias para transferirlos (Moore y Quadros, 2006; De Rosa, 2007). Esto muestra cómo la criopreservación embrionaria se creó como una necesidad ante la evolución de otras técnicas de reproducción asistida (Sommerfeld y Niemann, 1999; Yeoman *et al.*, 2001).

Hoy en día, las técnicas de criopreservación embrionaria son consideradas de rutina (Papadopoulos *et al.*, 2002; Moore y Quadros, 2006; Kader *et al.*, 2009), logrando congelar embriones desde 2 células hasta blastocistos (Capalbo *et al.*, 2011). Desde el nacimiento de las primeras crías producidas por embriones criopreservados, millones de animales domésticos, animales de laboratorio y niños han nacido de la criopreservación (Leibo, 2008). Además, se ha

logrado que los embriones criopreservados alcancen tasas de gestación muy cercanas a las obtenidas con embriones frescos (Van Wagtendonk-de Leew, den Das y Rall, 1997; Leibo y Mapletoft, 1998). Sin embargo, aún existe mucha variabilidad de resultados en cuestiones de supervivencia embrionaria post-congelación entre laboratorios (Moore y Quadros, 2006), por lo que aún se sigue experimentando con diferentes técnicas y protocolos. Se puede considerar que hay dos métodos para criopreservar embriones: la congelación lenta o convencional y la vitrificación (Moore y Quadros, 2006; Leibo, 2008). La primera se originó hace 40 años con el propósito de almacenar germoplasma por tiempo indefinido; mientras que la segunda, se creó 20 años más tarde (Vajta y Kuwayama, 2006) con el propósito de mejorar la supervivencia embrionaria post-descongelación. La principal diferencia entre estos dos sistemas radica en la proporción en la que se añaden los crioprotectores y la velocidad en el descenso de temperatura de cada uno (Leibo y Loskutoff, 1993; Vajta y Kuwayama, 2006; Capalbo *et al.*, 2011).

La vitrificación empezó utilizando las pajillas de inseminación de 0.25 ml empleadas para la congelación convencional como soporte para los embriones, las cuales eran sumergidas directamente en el nitrógeno líquido en lugar de usar máquinas congeladoras que graduaban el descenso de temperatura. Con el fin de mejorar la eficiencia de los protocolos, se creó el primer soporte de vitrificación: el Open Pulled Straw (OPS) (Vajta *et al.*, 1998), en el que, al restringir el volumen de medio dentro del soporte, se podía aumentar aún más la velocidad de enfriamiento y con ello el desarrollo embrionario post-desvitrificación. Así, se empezaron a crear diferentes soportes que permitieron ir incrementando la velocidad de enfriamiento y aumentando la supervivencia. El cryotop, un filamento de propileno muy delgado que sostiene a los embriones en un volumen aproximado de 0.1µl, fue creado con este propósito, y demostró desde el principio superioridad en la viabilidad embrionaria comparado con otros soportes (Kuwayama, 2007); sin embargo, son pocos los estudios con embriones bovinos y los métodos de evaluación embrionaria son subjetivos. Además, los resultados son poco reproducibles en otros sistemas de criopreservación (Vajta y Kuwayama, 2006) como cryoloop, mallas de microscopía electrónica, entre otros y por eso muchos laboratorios aún siguen implementando el sistema OPS como parte de su rutina al momento de vitrificar embriones. Este estudio compara el daño celular post-desvitrificación de los sistemas de criopreservación OPS y cryotop, y muestra que el segundo puede ser empleado como método de vitrificación de rutina en un laboratorio gracias a su simplicidad y rapidez.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Técnicas de reproducción asistida

Dentro de las ARTS, una de las más viejas es la Inseminación Artificial o IA (Basrur y King, 2005). La IA es la forma más eficaz y rápida de obtener mejoramiento genético, ya que el semen de un solo macho puede cubrir a un gran número de hembras, abarcar nivel internacional y perdurar después de su muerte (Basrur y King, 2005). Por otro lado, la manipulación del estro, la ovulación y la transferencia de embriones es vista como la contraparte femenina de la inseminación artificial (Seidel, 2003). Esta serie de manejos se conjuntan en lo que se conoce como MOET (Ovulación Múltiple y Transferencia Embrionaria) y tiene el fin de aumentar la presión de selección, aumentar el número de crías por hembra y reducir los intervalos generacionales (Mapletoft y Hasler, 2005). Así mismo, una ART empleada para la transferencia de embriones, que resulta más conveniente que la MOET, porque no interfiere con los ciclos reproductivos de las vacas y puede ser realizada esporádicamente o hasta varias veces por semana (Galli y Lazzari, 2005), es la recuperación de ovocitos por punción ovárica u OPU, que permite, mediante la ayuda de un transductor de ultrasonido unido a una aguja introducido por vía vaginal, aspirar los ovocitos de folículos dentro del ovario en una hembra donadora, para obtener material genético de la misma en cualquier edad y etapa reproductiva (Basrur, y King, 2005; Moore y Thatcher, 2006). La OPU funciona como alternativa para producir embriones bovinos ya que los ovocitos inmaduros colectados pueden entrar a una producción *in vitro* de embriones (IVP), en donde son madurados, fertilizados y los embriones resultantes son cultivados hasta que sean aptos para su congelación y/o transferencia (Galli y Lazzari, 2005).

Actualmente, la IVP a partir de ovocitos obtenidos por OPU es una técnica eficiente con diferentes protocolos establecidos (Mapletoft y Hasler, 2005; Betteridge, 2006) y es usada como alternativa para la obtención de embriones *in vivo*. Además, la IVP ha servido como herramienta para sustentar y crear otras tecnologías *in vitro* (Lonergan y Fair, 2008) como la clonación, la transgénesis y la transferencia de núcleo de células somáticas (Betteridge, 2006). Estas últimas son técnicas que a pesar de mostrar un gran potencial para la producción animal, existen muy pocas compañías que las emplean comercialmente debido a la poca eficiencia obtenida y a su elevado costo (Galli y Lazzari, 2005; Basrur, y King, 2005; Moore y Thatcher, 2006). Así, hoy en día la transferencia de embriones ha evolucionado en tres generaciones: la primera, de donación de

embriones *in vivo*, la segunda, la de embriones producidos *in vitro* y la tercera, la de las técnicas *in vitro* como la clonación y las técnicas que se derivaron de ésta (Galli y Lazzari, 2005).

El uso de las crecientes ARTS, creó la necesidad de preservar el exceso de embriones producidos y la criobiología resolvió ese problema. La criobiología se refiere a la ciencia que estudia los efectos de las bajas temperaturas en los sistemas celulares (Mazur, 1984). En la última parte del siglo pasado se demostró la capacidad para poder criopreservar células vivas a temperaturas menores de -150°C por tiempo indefinido (Woods *et al.*, 2004; Kuwayama, 2007). A lo largo de los años, se han logrado conservar células vegetales, bacterianas, tumorales, sanguíneas, semen, ovocitos y embriones entre otras, mediante éste procedimiento. La criopreservación de embriones fue exitosa por primera vez en embriones de ratón en el año de 1972 (Whittingham, 1977); sin embargo, no fue sino hasta 1987 cuando se logró criopreservar el primer embrión bovino producido *in vitro* (Fukuda *et al.*, 1990), lo que trajo consigo un gran número de ventajas prácticas y económicas. Además de eliminar el problema del número requerido de receptoras antes mencionado, ésta técnica también eliminó los problemas de manipular el ciclo estral de las vacas receptoras o sincronizarlas (Hafez y Hafez, 2002; Moore y Thatcher, 2006), para transferir a los embriones cuando la vaca estuviera preparada fisiológicamente, en lugar del momento en el que el embrión estuviera disponible (Leibo, 2008). La criopreservación también permite una mejoría en las importaciones de embriones en comparación con la del ganado en pie, ejemplo de esto son las reducciones de los periodos de cuarentena, mayor adaptabilidad de los animales y traslado de los embriones a cualquier ciudad o país, permitiendo así un gran intercambio de material genético. (Mapletoft y Hasler, 2005; Checure y Seidel, 2007).

3.2. Congelación convencional y vitrificación

El agua es considerada esencial para la estructura y función de todas las células vivas y los embriones están compuestos en más de 80% por agua (Seidel *et al.*, 1997). Cuando el agua se somete a temperaturas menores a los 0°C sufre un cambio de estado físico y se congela, lo que produce la formación de cristales. Cuando se congelan embriones esta cristalización es indeseable, debido a que dañan física y mecánicamente a las células, afectando su viabilidad (Martino *et al.*, 1996; Seidel, 1996). Por ello, todos los protocolos de congelación tienen como propósito primordial el deshidratar a la célula, ya que a menor cantidad de agua dentro de la célula menor

será la cristalización y el daño que se le infija (Albarracín, 2005). Cuando los embriones se mantienen a la temperatura del nitrógeno líquido (NL₂) -196°C, es posible detener por completo su actividad enzimática, respiración celular, metabolismo, crecimiento y multiplicación. Las únicas reacciones que ocurren en sistemas acuosos a dichas temperaturas son reacciones foto físicas, como puede ser la formación de radicales libres y el rompimiento de macromoléculas en caso de la existencia de una radiación iónica (Fong Siow *et al.*, 2007). Esto permite preservar a las células por periodos de tiempo indefinidos, sin afectar su desarrollo y sin producir cambios genéticos (Mazur, 1995).

Existen dos tipos de congelación: 1. de equilibrio o convencional y 2. de no equilibrio o vitrificación (Capalbo *et al.*, 2011). La diferencia esencial entre ambos es la velocidad con la que se disminuye la temperatura hasta alcanzar el punto de congelación, llamada también velocidad de enfriamiento. En cualquiera de los dos casos se tiene que someter a las células a los siguientes pasos para realizar una criopreservación exitosa: exposición al crioprotector, congelación por debajo de los 0°C, almacenaje, descongelación, remoción de los agentes crioprotectores y devolución a un ambiente fisiológico (Liebermann *et al.*, 2003). A continuación se describen las dos técnicas:

La congelación de equilibrio o convencional se basa en el principio de deshidratación celular (Moore y Quadros, 2006) con ayuda de agentes crioprotectores (CPAS). Aquí, el germoplasma es cargado en volúmenes de medio de 100 a 250 µl en pajillas de 0.25 ml que son enfriadas hasta llegar entre -5 y -7°C; y mantenidos a ésta temperatura durante 5 minutos para equilibrarlas (Saragusty y Arav, 2011). Posteriormente, en el área de la pajilla muy cercano a donde está el embrión se hace un enfriamiento directo que permita formar un núcleo de cristalización (seeding), disminuyendo finalmente a un ritmo de 0.3 a -0.5°C/ min hasta alcanzar temperaturas entre los -30 y los -65°C (Vajta y Kuwayama, 2006; Saragusty y Arav, 2011). Una vez que se alcanzan estas temperaturas, las pajillas se sumergen directamente en nitrógeno líquido. Después de la congelación, para restaurar sus funciones fisiológicas, los embriones son regresados a temperaturas orgánicas y si es necesario, los crioprotectores son removidos (Leibo, 2008). En este tipo de congelación no se requiere de mucha experiencia técnica, pero se necesita utilizar un equipo costoso para lograr el descenso controlado de la temperatura (Vajta, 2000; Moore y Quadros, 2006).

La congelación lenta asegura que la cristalización tenga lugar extracelularmente, ocasionando que el agua salga de las células mediante diferencias en la presión osmótica, para obtener una deshidratación gradual (Vajta, 2000; Vajta y Kuwayama, 2006; Tsang y Chow, 2010; Saragusty y Arav, 2011). El equilibrio se logra con concentraciones bajas de crioprotectores (10-11%) y una velocidad de enfriamiento de 0.3 a 0.5°C/min (Moore y Quadros, 2006; Tsang y Chow, 2010) lo que genera un ambiente controlado. Al haber formación de cristales extracelulares, se incrementa la osmolaridad extracelular, produciendo así que haya poca formación de cristales intracelulares (Vajta, 2000; Tsang y Chow, 2010) y una mínima deformación de la célula (Vajta y Kuwayama, 2006). Además, la congelación lenta, al realizarse en pajillas convencionales de inseminación, permite la transferencia embrionaria inmediata posterior a la descongelación como el glicerol y el etilenglicol (Mapletoft y Hasler, 2005). Otra ventaja de éste método es que el embrión no entra en contacto directo con el nitrógeno líquido y por lo tanto no hay riesgo de transmisión de enfermedades (Kuwayama, 2007).

Por otro lado, la vitrificación se define como la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales (Fahy *et al.*, 1990; Vajta, 2000), lo cual implica el contacto directo de la solución de vitrificación, los agentes crioprotectores y los embriones con el nitrógeno líquido (Liebermann *et al.*, 2011). Con la vitrificación se usan altas concentraciones de crioprotectores y una velocidad ultrarrápida de enfriamiento, por lo que los compartimientos intra y extracelulares se someten a la vitrificación una vez que la célula ha sido deshidratada (Saragusty y Arav, 2011). En este proceso, las soluciones dentro de la célula forman un estado viscoso o vítreo más que un estado sólido (Chian *et al.*, 2004; Mapletoft y Hasler, 2005; Moore y Thatcher, 2006; Moore y Quadros, 2006; Tsang y Chow, 2010). La viscosidad de un medio se puede relacionar con el tipo y la concentración de los crioprotectores al momento de la congelación. Entre mayor sea la concentración de estos, mayor será la temperatura de transición a hielo de la solución y mayor será la viscosidad, por lo tanto, el daño ocasionado por formación de cristales será menor (Saragusty y Arav, 2011; Liebermann *et al.*, 2011). Capalbo *et al.* (2011), describen esta transición a estado vítreo como un proceso cinético y no como un proceso termodinámico como el de la congelación convencional. Así, los daños mecánicos ocasionados por la formación de cristales se minimizan y se obtienen mejores tasas de supervivencia celular (Sommerfeld y Niemann, 1999; Vajta y Kuwayama, 2006; Tsang y Chow, 2010).

La vitrificación implica dos mecanismos: el del incremento de la velocidad de conducción de temperatura y el del incremento en la concentración de crioprotectores (Liebermann *et al.*, 2011). Entre mayor sea la velocidad de enfriamiento la concentración de crioprotectores usados puede ser reducida y así también disminuir posibles choques osmóticos y tóxicos. El éxito de la vitrificación consiste en lograr una alta velocidad de enfriamiento (15000 a 30000°C/min) (Lieberman *et al.*, 2003; Moore y Quadros, 2006) utilizando una concentración alta de crioprotectores (40-60%) sin llegar a un nivel de toxicidad (Tsang y Chow, 2010; Sriponya *et al.*, 2010). Para lograr estas velocidades de enfriamiento, los embriones son colocados en diferentes medios con concentraciones crecientes de crioprotectores (Saragusty y Arav, 2011). El primer medio debe contener entre 7.5% y 10% de una combinación de dos crioprotectores permeables, siendo los más empleados el etilenglicol, el propanodiol y el dimetilsulfóxido (Vajta *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 1999; Yeomann *et al.*, 2001, Cremades *et al.*, 2004; Bonilla *et al.*, 2007). El segundo medio, contiene una concentración un poco más alta de los mismos crioprotectores que varía entre el 15% y 20%, con la adición de un crioprotector no permeable, la mayoría de las veces sacarosa en concentraciones de 0.5 M (Vajta *et al.*, 1998, Chang *et al.*, 2006; De Rosa, 2007; Morató *et al.*, 2008; Bonilla *et al.*, 2007; Lazcano *et al.*, 2010). Una vez que los embriones han pasado por las diferentes concentraciones crioprotectoras y están deshidratados, se colocan en sus respectivos soportes y éstos se sumergen directamente en el nitrógeno líquido (Chian *et al.*, 2004; Bonilla *et al.*, 2007). El éxito de la vitrificación puede calcularse mediante la siguiente fórmula (Saragusty y Arav, 2011):

$$\text{Vitrificación} = \frac{\text{Tasa de Enfriamiento X Viscosidad}}{\text{Volumen}}$$

Las ventajas de la vitrificación son su rapidez, simplicidad (Mapletoft y Hasler, 2005, Sriponya *et al.*, 2010) y la obtención de altos índices de viabilidad celular post- desvitrificación (Moore y Quadros, 2006; Tsang y Chow, 2010). Sin embargo, dos problemas de la vitrificación, por los cuales algunos laboratorios siguen prefiriendo usar la congelación convencional, son que no todos los soportes permiten transferir a los embriones directamente del soporte al útero del animal y la posible transmisión de enfermedades durante el almacenaje (Lane *et al.*, 1999; Vajta, 2000). Este último se incrementa cuando se emplean soportes abiertos donde los embriones quedan

expuestos directamente al nitrógeno líquido. Algunas de las enfermedades que pueden transmitirse así son: leucosis bovina, lengua azul, brucella abortus, rinotraqueitis infecciosa bovina y encefalopatía espongiiforme bovina (Mapletoft y Hasler, 2005). Para prevenir esto, existe una regulación por la FAO (Food and Agriculture Organization) la cual estipula que antes y después de la desvitrificación debe revisarse la integridad de la zona pelúcida al microscopio y lavar a los embriones con tripsina para disociar a los virus que puedan estar adheridos a dicha estructura (Seidel y Seidel, 1991)

3.2.1. Velocidad de enfriamiento

La velocidad de enfriamiento en la criopreservación se puede definir como el tiempo en que una muestra se tarda en enfriar al someterla a un descenso de temperatura por debajo de los 0°C (Liebermann *et al.*, 2011). Ésta velocidad, es determinante para la viabilidad embrionaria (Leibo y Loskutoff, 1993). Según la ley de enfriamiento de Newton, la velocidad a la que un objeto se enfría es proporcional a la diferencia entre su propia temperatura y la temperatura del ambiente (Winterton, 1999). Una velocidad de enfriamiento óptima para una célula es aquella que permite la salida de la mayoría del agua contenida dentro de la misma para que sea congelada extracelularmente (Liebermann *et al.*, 2011). Es importante que las células atraviesen rápidamente la zona crítica de temperatura que va de los 15 a los -5°C con el fin de disminuir las lesiones por enfriamiento. En la vitrificación, esto se logra al sumergir directamente los soportes que contienen las células en el nitrógeno líquido. Los factores que actúan directamente sobre la velocidad de enfriamiento son: la concentración de los crioprotectores, el volumen de muestra usado en el soporte y los materiales de fabricación del soporte.

La concentración de crioprotectores produce una variación en la velocidad de enfriamiento, ya que a una mayor concentración de crioprotectores la velocidad de enfriamiento se precipita y las muestras se congelan más rápido, pero se compromete su viabilidad debido a la toxicidad de los crioprotectores. Por eso, se prefiere establecer una concentración de crioprotectores tolerable para los embriones que logre acelerar lo suficiente la velocidad de enfriamiento para asegurar su viabilidad (Vajta y Kuwayama, 2006; Liebermann *et al.*, 2011).

Otra forma de aumentar la velocidad de enfriamiento es mediante la disminución del volumen en el que la célula es vitrificada. La disminución de volumen en los soportes permite que haya una mayor transferencia de temperatura hacia la célula, acelerando la velocidad de enfriamiento (Vajta, 2000; Lazcano *et al.*, 2010; Saragusty y Arav, 2011). Al reducir el volumen, la formación de vapores aislantes alrededor de la muestra disminuye (Liebermann *et al.*, 2011) y con esto aumenta su facilidad para transmitir la temperatura y congelarse más rápido.

El contacto directo del embrión con el nitrógeno líquido, que se produce en los sistemas abiertos de vitrificación, acelera la velocidad de enfriamiento aún más que su comparación con los sistemas cerrados, por lo tanto en éstos últimos se debe de considerar hacer las paredes de los soportes ultradelgadas y de materiales que tengan una alta conducción térmica (Kader *et al.*, 2009).

El último recurso para apresurar la velocidad de enfriamiento se basa en disminuir la temperatura del nitrógeno líquido (Abdalla *et al.*, 2010), mediante una aspiradora que ejerce presión negativa, eliminando los vapores para que el líquido alcance temperaturas -210°C (Kader *et al.*, 2009). Así, en la vitrificación con el empleo de soportes con materiales conductores de calor, volumen mínimo ($<1\ \mu\text{l}$) y con concentraciones adecuadas de crioprotectores, se pueden conseguir velocidades de enfriamiento que van de 15000 a 70000 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Kader *et al.*, 2009; Liebermann *et al.*, 2011).

3.2.2. Crioprotectores

Los agentes anticongelantes o crioprotectores (Cryoprotectants o CPA'S) (Tsang y Chow, 2010) son sustancias que han mostrado ser efectivas para reducir la formación de cristales durante el proceso de criopreservación (Abdalla *et al.*, 2010, Liebermann *et al.*, 2011). Sin embargo, existe una cantidad definida de crioprotectores que toleran las células (Liebermann *et al.*, 2011), ya que una concentración alta de crioprotectores puede ser mortal para el embrión (Sommerfeld y Niemann, 1999; Lane y Gardner, 2001) debido a que puede producir un choque osmótico en las células. Esta toxicidad disminuye al exponer a las células a bajas temperaturas (Vajta y Kuwayama, 2006), al combinar más de un agente crioprotector, al reducir el periodo de exposición al crioprotector y al realizar una exposición gradual al mismo (Fahy *et al.*, 1990; Naitana *et al.*, 1995; Moore y Quadros, 2006; Vajta y Kuwyuayama, 2006, Kader *et al.*, 2009; Liebermann *et al.*, 2011). Considerando el grado de toxicidad, el etilenglicol se encuentra en primer lugar, seguido por el

propanodiol, el glicerol, el DMSO (Dimetilsulfóxido) y la acetamida (Otoi *et al.*, 1995, Somerfeld y Niemann, 1999; Chang *et al.*, 2006; De Rosa, 2007; Morató *et al.*, 2008; Bonilla *et al.*, 2007; Lazcano *et al.*, 2010).

La combinación de varios crioprotectores permite una disminución en su toxicidad. Algunas combinaciones comunes usadas para la vitrificación son:

- EG+DMSO
- EG+Glicerol
- EG+Propanodiol

Por otro lado, los crioprotectores de acuerdo a su capacidad para atravesar la membrana, pueden clasificarse como permeables y no permeables. Ejemplos de crioprotectores permeables son: etilenglicol (EG), glicerol, propanodiol, DMSO; y de no permeables, son los azúcares como la sucrosa (Saragusty y Arav, 2011). Además, la permeabilidad hacia los crioprotectores varía dependiendo de la especie y el estadio del embrión (Leibo, 2008).

3.2.2.1. Etilenglicol

El etilenglicol es uno de los crioprotectores más permeables (Fahy *et al.*, 1990; Moore y Quadros, 2006; Saragusty y Arav, 2011), presenta cierta toxicidad celular a altas concentraciones (Chian *et al.*, 2004), y es el CPA mayormente usado. Su rápida difusión a través de la membrana plasmática gracias a su estructura sencilla (C₂H₆O) y bajo peso molecular (62.068 g/mol) (Emiliani *et al.*, 2000) permite que el tiempo de exposición al crioprotector se reduzca y que salga más rápido del embrión durante la descongelación (Moore y Quadros, 2006). Además, presenta la ventaja que no necesita ser removido previo a su transferencia (Sommerfeld y Niemann, 1999).

El etilenglicol es un anticongelante comúnmente usado en vehículos, aires acondicionados e incluso para reducir la formación de cristales en el helado. Funciona captando energía del agua al generar más enlaces de hidrógeno, disipando el calor. Por sí solo, el etilenglicol presenta un punto de congelación muy bajo. Sin embargo, al diluirlo (60% etilenglicol + 40% agua) se congela al alcanzar los -45°C (Siegfried y Meyer, 2002). Así, cuando se adiciona el EG como medio de vitrificación a los embriones, ayuda a reducir significativamente el punto de congelación. En

embriones bovinos este crioprotector se usa a concentraciones de 1.5-1.8 M con congelación convencional y hasta 7.2 M cuando se emplea la vitrificación (Vajta *et al.*, 1998, Chang *et al.*, 2006; De Rosa, 2007; Morató *et al.*, 2008; Bonilla *et al.*, 2007; Lazcano *et al.*, 2010). Una de las desventajas de sobreexponer a los embriones al EG, además de un posible choque osmótico, es el endurecimiento de la zona pelúcida debido al incremento de calcio que produce dentro del embrión (Larman *et al.*, 2006), por lo que su uso debe de ser consciente y moderado.

Cuadro 1. Variación que ejerce la adición de EG sobre el punto de congelación (Hollis *et al.*, 2002).

Porcentaje EG (%) en la solución	Variación del punto de congelación (°C)
0	0
10	-4
20	-7
30	-15
40	-23
50	-34
60	-48
70	-51

En el cuadro 1 se puede observar como a medida que sube la concentración de crioprotectores en una célula disminuye proporcionalmente el punto de enfriamiento.

3.2.2.2. Propanodiol

Este crioprotector también es llamado 1,2-propanodiol , propilenglicol o PROH. En años recientes, se ha incrementado su uso, especialmente cuando se vitrifican embriones u ovocitos humanos y bovinos, ya que se ha observado que ocasiona menos toxicidad en las células y también es más permeable (Chian *et al.*, 2004). Al igual que el etilenglicol, este crioprotector reduce el punto de congelación del agua, por lo que ayuda a incrementar la velocidad de enfriamiento (Lazcano *et al.*, 2010). Este crioprotector también es muy usado como anticongelante para vehículos, deshielar las

pistas de los aviones en los aeropuertos e inclusive como aditivo de alimentos y productos cosméticos (Chemindustry, 2010).

3.2.2.3. Azúcares

Los azúcares usados para la criopreservación se dividen en monosacáridos como: glucosa, fructuosa, sorbitol y manitol, y en disacáridos como la sacarosa y la trealosa (Eroglu *et al.*, 2005; Moore y Quadros, 2006; Saragusty y Arav, 2011). Los azúcares son compuestos que no penetran las células (Liebermann *et al.*, 2011), y por lo tanto, ayudan a la deshidratación celular aumentando la osmolaridad del medio extracelular y preservando la integridad estructural del embrión (Moore y Quadros, 2006). Además, los azúcares reducen la concentración necesaria de agentes crioprotectores permeables como el EG y PROH.

3.2.2.4. Polímeros

Las investigaciones recientes que tratan de optimizar las técnicas de vitrificación se están concentrando en la mejoría de los agentes crioprotectores, cambiando el medio base en el que son hechos (Leibo, 2008) para volverlos menos tóxicos (Stacheki *et al.*, 2006) e incluso añadiendo sustancias protectoras contra ellos, como los polímeros (Pugh, Tervit y Niemann, 2000). Así, polímeros como la polivinilpirrolidona (PVP), el polietilenglicol (PEG) o el Ficoll ayudan a disminuir la cantidad de crioprotectores permeables (Kader *et al.*, 2009), además de brindar protección a las células contra daños por enfriamiento y aumentar la viscosidad del medio (Liebermann *et al.*, 2011).

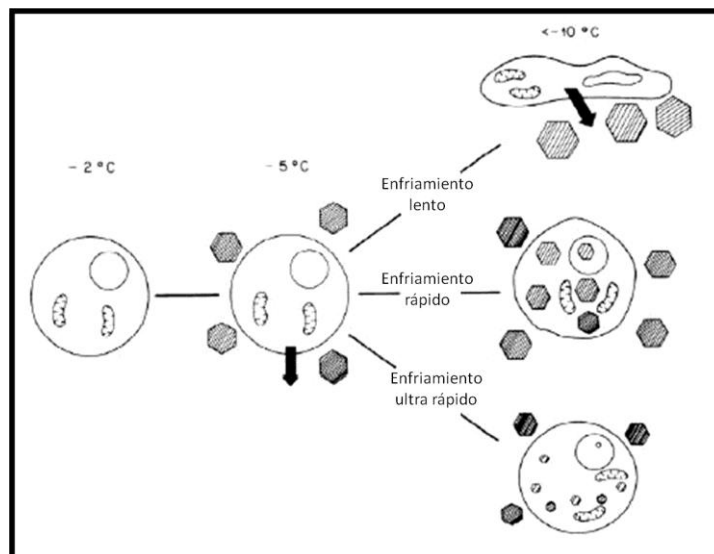
3.3. Daño celular

Todos los embriones y ovocitos que son criopreservados sufren daños morfológicos y funcionales durante el proceso (Vajta y Kuwayama, 2006), los cuales pueden influir en el posterior desarrollo del embrión (Capalbo *et al.*, 2011). La extensión del daño celular será dependiente del tamaño y forma de las células, la permeabilidad de las membranas y la calidad de los ovocitos u embriones (Vajta y Kuwayama, 2006). Todos estos factores son muy variables dependiendo de la especie,

estado de desarrollo y origen (*in vivo* o *in vitro*) (Vajta, 2000). Así, el propósito de la criopreservación debe de ser minimizar los daños generados para asegurar la viabilidad.

Los daños que puede sufrir un embrión durante su criopreservación son principalmente daños causados por el cambio drástico de temperatura y la formación de cristales, pueden ser daños osmóticos y tóxicos, también fracturas en la zona pelúcida o en los blastómeros y alteraciones en el citoplasma (Liebermann *et al.*, 2011). Para los daños por formación de cristales, la tasa de enfriamiento es el punto clave. Así, a una tasa de enfriamiento lenta, el hielo crece lentamente hasta formar grandes cristales, secuestrando entre ellos a los solutos disueltos; mientras que con tasas más altas de enfriamiento, el hielo crece más rápido, forma cristales más pequeños y logra que los solutos permanezcan entre los canales de hielo (Leibo, 2008). En un estudio donde se midió la cantidad de cristales formados a medida que la temperatura disminuía, se observó que una velocidad de enfriamiento menos rápida ocasionó una mayor acumulación de cristales alrededor de las células, los cuales vistos bajo el microscopio, infringen daños directos sobre las membranas celulares perjudicando su integridad (Mazur, 1984). Contrariamente, el incremento en la velocidad de enfriamiento produjo cristales intracelulares más chicos, que ocasionaron menor daño (Mazur, 1984), esto se puede ver en la Figura 1. Además, los cristales pequeños no se recrystalizan cuando la célula regresa a su temperatura original, por lo que se daña menos a los embriones (Morató *et al.*, 2008 y Cobo *et al.*, 2008).

Figura 1. Efecto de la tasa de enfriamiento sobre la formación de cristales (Mazur 1984).



El agua se transporta con facilidad a través de una membrana semipermeable por medio de ósmosis, lo que implica el transporte de una región con menor concentración de solutos a una región con mayor concentración (Karp, 2005). Cuando se coloca a una célula en una solución hipotónica, como se hace en el caso de soluciones con crioprotectores no permeables, ésta va a captar agua por ósmosis y se va a agrandar, si se coloca en una sustancia hipertónica sale agua y pierde tamaño. Cuando una célula es expuesta a una solución hipertónica, la salida de agua es dependiente de la permeabilidad de la membrana determinada por su composición y la superficie de su área (Leibo, 2008). Un embrión bovino tiene un área aproximada de $2.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, mucho mayor que la de un embrión de ratón que es de $7.1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (Leibo, 2008), por lo tanto, en un embrión bovino la capacidad para deshidratar a la célula incrementa y con esto dificulta también su habilidad para su criopreservación. El choque osmótico ocurre cuando no se logra un equilibrio entre las concentraciones de solutos intra y extracelulares, ocasionando daños dentro de las células. En la vitrificación este tipo de choque podrá ser controlado con concentraciones que no sean tóxicas y la exposición gradual de los mismos (Vajta, 2000).

Por otro lado, una última variable que puede impactar en el daño ejercido sobre los embriones al momento de la vitrificación es el embriólogo. Los resultados obtenidos con la vitrificación son altamente dependientes del operador y requieren de un correcto entrenamiento y experiencia a diferencia de la congelación convencional. En este tipo de criopreservación el tiempo y la precisión son factores importantes (Kader *et al.*, 2009).

3.4. Soportes de vitrificación

En la vitrificación, el soporte es el lugar donde se posiciona a los embriones con la menor cantidad de medio posible para que sean sumergidos directamente en el nitrógeno líquido (Kader *et al.*, 2009). El propósito principal del soporte es fijar al embrión con un volumen mínimo de medio para lograr una rápida velocidad de enfriamiento que disminuya el daño embrionario (Kuwayama, 2007). Desde hace dos décadas, se han creado diferentes soportes con el fin de facilitar la vitrificación de ovocitos y embriones (Tsang y Chow, 2010, Sripunya *et al.*, 2010). En la criopreservación convencional sólo existe un soporte, las pajillas de inseminación de $0.25 \mu\text{l}$ mientras que para la vitrificación hay decenas de ellos, que se pueden dividir en dos tipos: abiertos y cerrados (Tsang y Chow, 2010), algunos de los cuales se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Soportes diseñados para la vitrificación de ovocitos y embriones

SOPORTE	ESPECIE	ESTRUCTURA	VOLUMEN	CRIOPROTECTORES	TIPO DE SOPORTE	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
OPS (Open Pulled Starw)	Bovino	Embriones	1-2µl	EG+DMSO+Sacarosa	Abierto	Mini pajillas de plástico con 1.7 mm de diámetro y 0.8mm de grosor.	Vajta <i>et al.</i> ,1998
	Equino	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			Oberstain <i>et al.</i> , 2000
	Bovino	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			Morató <i>et al.</i> , 2008
	Ratón	Ovocitos		EG			Chen <i>et al.</i> , 2001
CPS (Closed Pulled Straw)	Ratón	Ovocitos	1-2µl	EG	Cerrado	Mini pajillas de vidrio igual a OPS, pero los embriones quedan separados por columnas de medio.	Chen <i>et al.</i> , 2001
Puntas de pipeta	Humano	Embriones	<1µl	EG+DMSO+Sacarosa	Abierto	Micropipetas de manipulación de embriones 0.1-10µl y 1.5mm de diámetro.	Cremades <i>et al.</i> , 2004
	Hurón	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			Sun <i>et al.</i> , 2008
	Bovino	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			Liebermann <i>et al.</i> , 2003
Hemi-straw	Humano	Embriones	<1µl	-----	Abierto	Pajilla de 0.25µl cortada y adaptada y almacenada en criovial.	Vanderzwalmen <i>et al.</i> ,2002
Criotubo	Ratón	Embriones	30µl	DMSO+PROH+Sacarosa	Cerrado	Criotubo 1.8 ml.	Bagis <i>et al.</i> ,2004
In straw	Bovino	Embriones	<1µl	EG+ Sacarosa	Cerrado	Pajilla de 0.25µl a los cuales se les introduce la gota de embriones con una pipeta.	Otoi <i>et al.</i> , 1995
	Humano	Ovocitos		EG+DMSO+Sacarosa			Kuwayama <i>et al.</i> , 2005
Mallas de microscopía electrónica	Bovino	Ovocitos	<1µl	EG+ Sacarosa	Abierto	Mallas de microscopía electrónica de 3.05mm de diámetro y 0.037mm de grosor.	Martino, Songsasen y Leibo, 1996
	Humano	Embriones		EG+ Sacarosa+ Ficoll			Park <i>et al.</i> , 2000
	Ratón	Ovocitos		EG			Chen <i>et al.</i> , 2001

Cuadro 2. Soportes diseñados para la vitrificación de ovocitos y embriones

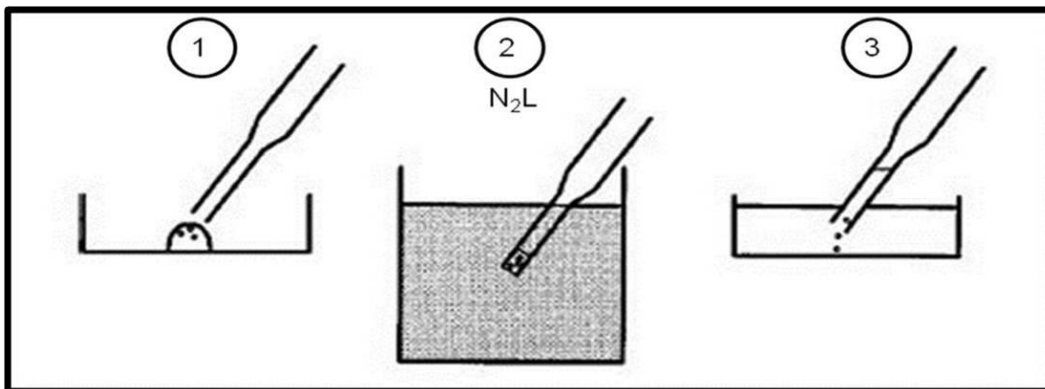
SOPORTE	ESPECIE	ESTRUCTURA	VOLUMEN	CRIOPROTECTORES	TIPO DE SOPORTE	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Micro gotas	Bovino, humano	Embriones	1-2µl	-----	Abierto	Parafilm con un pequeño tanque donde se depositan los embriones.	Chang <i>et al.</i> 2006
	Ratón	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			Dhali <i>et al.</i> , 2009
Cryoloop	Hamster, ratón	Embriones	<1µl	EG+DMSO+Sacarosa	Abierto	Aro de nylon sujetado por un mango de aluminio, 20 µm de ancho, 0.7mm de diámetro.	Lane <i>et al.</i> ,1999; Lane <i>et al.</i> , 2001
	Primate	Embriones		EG+ Sacarosa+ Ficoll			Yeomann <i>et al.</i> , 2001
	Equino	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			Oberstain <i>et al.</i> , 2000
	Bovino	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			Morató <i>et al.</i> , 2008
Cryotop	Bovino, humano	Embriones	<1µl	EG+DMSO+Sacarosa	Abierto	Filamento de polipropeleno de 0.4mm de ancho por 20mm de largo por 0.1mm de espesor.	Kuwuayama, 2007
	Bovino, humano	Embriones		EG+DMSO+Sacarosa			De Rosa <i>et al.</i> , 2007
	Humano	Embriones		EG+PROH+Sacarosa			Lazcano <i>et al.</i> , 2010
	Bovino	Ovocitos		EG+PVP+Trealosa			Sripunya <i>et al.</i> , 2010
Cryo-leaf	Humano	Ovocitos	<1µl	EG+PROH+Sacarosa	Abierto	Estampa de acetato de 20X 5X0.2mm.	Chian <i>et al.</i> , 2005
Cryotip	Bovino	Embriones	<1µl	EG+DMSO+Sacarosa	Cerrado	Capilares de plástico con paredes muy delgada al cual se le sellan los extremos.	Kuwuayama, 2007
Espátula de vitrificación	Ratón	Embriones	0.5µl	EG+ Sacarosa+ Ficoll	Abierto	Punta de espátula 1mm ² montada en la punta de un criotubo para su posterior almacén.	Tsang <i>et al.</i> , 2009
Superficie sólida de vitrificación	Bovino	Ovocitos	2µl	EG+PVP+Trealosa	Abierto	Superficie sólida de aluminio que flota en el itrógeno líquido.	Sripunya <i>et al.</i> , 2010
	Ratón	Embriones		DMSO+PROH+Sacarosa			Bagis <i>et al.</i> .,2004

3.4.1. OPS

Este tipo de soporte se obtiene al usar pipetas de plástico o vidrio con un diámetro aproximado de 0.07 mm. Los embriones o células que se van a congelar, se introducen por medio de capilaridad al acercar la boca de la pipeta a la gota de 1-2 μl que contiene a los embriones (Vajta *et al.*, 1998; Vajta, 2000) o alternativamente se recurre a la ayuda de una jeringa de insulina para succionarlos hacia el capilar. Los ovocitos o embriones quedarán suspendidos en una columna de líquido de aproximadamente 1-1.5 μl . (Kuwayama *et al.*, 2005) (Figura 2).

Las ventajas de la utilización del OPS sobre los soportes utilizados en el método de congelación lenta es que al disminuir el grosor de la pared de la pipeta donde se está congelando, se logra una aceleración en la velocidad de enfriamiento al congelar y calentamiento al desvitrificar cuando se reduce el volumen de medio de 5 μl a 1 μl . La velocidad de enfriamiento obtenida con éste método es de de aproximadamente 25000°C/min (Vajta, 2000; Chang, 2006). Los embriones vitrificados en OPS, muestran menos fracturas en la zona pelúcida y al ser sumergidos por menos tiempo en las soluciones crioprotectoras sufren menos daños tóxicos y osmóticos (Vajta *et al.*, 1998). La principal desventaja de este soporte es que los embriones entran en contacto directo con el nitrógeno líquido (Lane *et al.*, 1999) (Figura 2).

Figura 2. Método de vitrificación OPS (Vajta *et al.*, 1998).

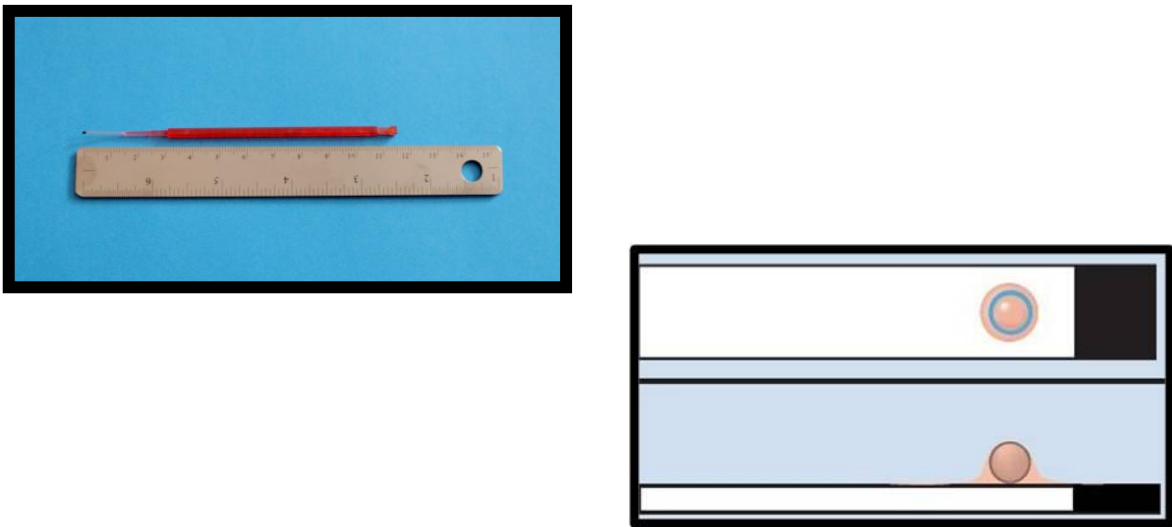


La Figura 2 muestra: 1. Embriones suspendidos en una gota y su introducción en el OPS por medio de capilaridad; 2. El sistema OPS conteniendo a los embriones se sumerge directamente en el nitrógeno líquido; 3. Desvitrificación de los embriones vaciando el OPS directamente sobre la solución de desvitrificación.

3.4.2. Cryotop

Este sistema está basado en la teoría del volumen mínimo de vitrificación (Cobo *et al.*, 2008). El Cryotop es un soporte inventado por Kuwayama M (Kitazato Ltd., Japón) en el cual una pequeña porción de polipropileno de 0.4 mm de ancho por 20 mm de largo por 0.1 mm de espesor (García-Amador *et al.*, 2009, Lazcano *et al.*, 2010) está unido a un mango de plástico (Vajta y Kuwayama, 2006) (Figura 3). En éste sistema, los embriones se colocan en la punta del filamento y se sumergen directamente en el nitrógeno líquido para su vitrificación y sobre la solución rehidratante durante la desvitrificación con un volumen de tan solo 0.1 μ l (Vajta y Kuwayama, 2006, García-Amador *et al.*, 2009, Lazcano *et al.*, 2010). Esto ocasiona que las velocidades de enfriamiento y calentamiento sean muy rápidas hasta 700,000 $^{\circ}$ C/min (Kuwayama, 2007) y además que la concentración de crioprotectores sea baja, favoreciendo una mejor viabilidad embrionaria.

Figura 3. Diagrama del cryotop



En la figura se observa cómo se posiciona un embrión al ser vitrificado mediante el método de cryotop y la cantidad mínima de volumen que necesita (0.1 μ l).

3.5. Evaluación embrionaria

El determinar la viabilidad y la calidad de un embrión es esencial para asegurar el potencial de desarrollo del mismo (Baczkowski *et al.*, 2004). Los métodos de evaluación embrionaria han cambiado durante los últimos años e incluyen tanto procedimientos invasivos como métodos que no causan daño alguno al embrión.

La evaluación morfológica, al ser un método no invasivo, es la técnica más empleada. Sin embargo, existen diferentes parámetros que se pueden emplear para la evaluación de un embrión bajo el microscopio, por lo que varios laboratorios han instaurado sistemas de clasificación específicos con el fin de disminuir la subjetividad (Desai *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000; Tesarik *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 2001; Baczkowski *et al.*, 2004; Moriwaki *et al.*, 2004).

Los principales parámetros que se consideran en la evaluación morfológica son:

- Color del embrión.
- Apariencia del citoplasma.
- Apariencia e integridad de la zona pelúcida.
- Diferenciación entre masa celular interna y trofoblasto.
- Número de blastómeros.
- Tamaño, forma y simetría de los blastómeros.
- Compactación y expansión de blastómeros.
- Multinucleación en los blastómeros.

Los avances de microscopía, como son la modulación de contraste (Hoffmann) o el contraste de fases (DIC), permiten una valoración morfológica más precisa (Aguilar *et al.*, 2002; Baczkowski *et al.*, 2004). Sin embargo, ésta puede resultar subjetiva y los embriones que se clasifiquen de forma incorrecta pueden ocasionar la reducción en la fertilidad de las hembras receptoras (Contreras *et al.*, 2008), además de pérdidas de dinero y tiempo. Es por ello que se han desarrollado otras técnicas que tienen la desventaja de ser invasivas pero cuyos parámetros de medición son objetivos y garantizan la determinación de la viabilidad. Algunos ejemplos de éstas son:

- Cultivo por un periodo post-congelación (Contreras *et al.*, 2008).
- Mediciones de actividad enzimática (Schilling *et al.*, 1997).
- Consumo de glucosa (Gardner *et al.*, 2001; Sutton-McDowall *et al.*, 2010).
- Consumo de piruvato (Gardner *et al.*, 2001).
- Metabolismo de aminoácidos (Stokes *et al.*, 2007).
- Consumo de oxígeno o función mitocondrial (Lopes *et al.*, 2005).
- Tinciones vitales (Paula-Lopez y Hansen, 2001; Moreira *et al.*, 2001).
- Marcadores de biomoléculas o ciencia metabolómica (Botros *et al.*, 2008).

Las tinciones vitales son técnicas que se auxilian de la microscopía y usan sustancias o tinturas para resaltar estructuras específicas en tejidos o células (Moreira *et al.*, 2001). Estas sustancias, se fijan a la célula mientras aún está viva, pero como son altamente tóxicas en los embriones causan su muerte una vez que son empleadas (Hiroyuki y Hiroyoshi, 2003). Algunas tinciones vitales empleadas en los embriones son: Bromodeoxiuridina (BrdU) la cual tiñe células vivas (Moussa *et al.*, 2005); Hoechst DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole) las cuales tiñen células vivas o previamente fijadas (Moreira *et al.*, 2001; Juriscova *et al.*, 1996); Ioduro de Propidio (IP), TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl transferasa mediated dTUP Nick- end- labeling) y Azul Tripán que tiñen células muertas (Chen *et al.*, 2001; Paula-Lopez y Hansen, 2001).

3.5.1. Evaluación del daño en el DNA

En los organismos superiores se reconocen dos formas de muerte celular: necrosis y apoptosis. La necrosis se caracteriza por la desintegración nuclear, hinchazón celular, ruptura de membranas internas y externas, liberación de enzimas y por consiguiente daño a células vecinas, lo que desencadena un proceso inflamatorio. Este evento es ocasionado por algún daño a la célula como trauma, hipoxia o estrés calórico. A diferencia de la necrosis, la apoptosis se caracteriza por la disminución de tamaño y condensación de la célula, el colapso del citoesqueleto, el desensamble de la envoltura nuclear y la condensación y fragmentación de la cromatina, la membrana se contrae formando protuberancias y origina los cuerpos apoptóticos, los cuales atraen a los macrófagos ocasionando una muerte limpia que no causa daño ni respuesta inflamatoria (Hardy *et al.*, 1998; Matwee *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2009).

La función de la apoptosis durante el desarrollo embrionario es la de proveer un control de calidad, eliminando células anormales, fuera de lugar, sin función o que pueden causar un daño (Hardy, 1999). Por lo tanto, la muerte celular ocurre en el desarrollo embrionario tanto *in vivo* como *in vitro*; aunque se ha visto que al desarrollar embriones fuera de su ambiente fisiológico las probabilidades de apoptosis aumentan, principalmente por su exposición a radicales libres por la variación de las concentraciones de O₂ (Van Soom *et al.*, 2002).

Estudios realizados por Matwee (2000), Van Soom *et al.* (2002) y Márquez *et al.* (2005), demuestran que el grado de apoptosis es dependiente de la etapa de desarrollo de un embrión y su número de células. Así, se ha observado que existe poca reacción apoptótica en embriones jóvenes con menos de 30 células, pero a medida que aumenta el número de células se incrementa la posibilidad de encontrar células apoptóticas, lo que a su vez se refleja en deterioro de la calidad y reducción de la viabilidad del embrión (Roelen *et al.*, 2005). A pesar de lo anterior, debe considerarse que la apoptosis es esencial en el proceso de embriogénesis y morfogénesis (Hardy, 1999).

La comprobación del número de células apoptóticas dentro de un embrión puede considerarse como medidor de su viabilidad, y para calcular esta tasa, se usan marcadores celulares como el TUNEL (Marquez *et al.*, 2005). Esta técnica se basa en el principio de que durante la apoptosis la endonucleasa corta fragmentos de ADN entre los nucleosomas, lo que genera muchos finales de ADN nuevos con extremos 3'-OH, los cuales se marcan usando el nucleótido marcador de fluoresceína-dUTP. La reacción se hace evidente con la enzima TdT (Desoxinucleotidil transferasa) permitiendo de esta manera su localización y cuantificación (Alberts *et al.*, 2009). Márquez *et al.*, (2005) proponen un conteo indicativo de la calidad embrionaria después del TUNEL, donde se consideran embriones en etapa de blastocisto de buena calidad a aquellos con 15 a 20 células positivas a TUNEL o apoptóticas, y de mala calidad a aquellos con un conteo de células positivas a TUNEL mayor a 21.

3.5.2. Evaluación total de células

Existen dos tipos de tinciones Hoechst evaluar el número total de células que son la 33258 y la 33342, ambas relacionadas con las bis-benzimidazoles y excitadas por luz UV a 350 nm emitiendo una luz azul fluorescente. Su diferencia radica en que la Hoechst 33342 contiene un grupo etilo además lo que la hace más lipofílico y por lo tanto más capaz para atravesar membranas. Sin embargo ambos son tinciones solubles en agua, que al atravesar la membrana celular se adhieren a la hebra menor del ADN, en donde tendrá preferencia por regiones ricas en adenina y timidina. Esta prueba puede utilizarse tanto en células vivas como en células previamente fijadas para distinguir ADN, núcleos y mitocondrias (Moreira *et al.*, 2001).

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal

El objetivo de este estudio fue comparar la viabilidad post-criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro* y vitrificados por las técnicas de “Open Pulled Straw” (OPS) y Cryotop.

4.2. Hipótesis

Los embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro* y vitrificados por la técnica de cryotop al contener menor volúmen de vitrificación y una curva de enfriamiento más rápida presentan mejor supervivencia post-vitrificación, que aquellos vitrificados por la técnica de OPS.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Producción y cultivo de embriones *in vitro*

La producción de embriones para la estandarización de las técnicas de TUNEL y BrdU se llevó a cabo en el laboratorio Biogenetic, ubicado en el municipio de Comalcalco, Tabasco; y la producción de embriones para la realización de los estudios de viabilidad, se llevó a cabo en el laboratorio Brasuca, ubicado en la ciudad de Villahermosa, Tabasco. El protocolo de producción de embriones y los medios usados fueron los mismos en ambos laboratorios.

5.1.1. Recolección y selección de ovocitos

Para la obtención de los ovocitos bovinos, se usaron ovarios de vacas y vaquillas recolectados del rastro de Villahermosa, Tabasco. Los ovarios se obtuvieron entre 10 y 15 minutos después del sacrificio y se transportaron al laboratorio en solución salina a 25°C en un tiempo no mayor a 2 horas. Al llegar al laboratorio, los ovarios se enjuagaron con solución salina a 25°C para eliminar restos de sangre. Los complejos ovocito y células del cúmulo (COC) fueron aspirados de los folículos antrales de 2-8mm con agujas del número 18, siguiendo el procedimiento descrito por Fuhrer *et al.* (1989) y Lonergan *et al.* (1994). El líquido folicular aspirado se vertió en tubos Falcon de 50 ml, que se dejaron reposar durante 5 min en una incubadora para que se formara un precipitado que contuviera los ovocitos y detritus celulares de mayor tamaño, quedando el líquido folicular y células de la granulosa como sobrenadante. Ese líquido folicular se centrifugó a 252 g durante 4 min (Seidel, 1981; Romero-Arredondo y Seidel, 1996) para su posterior utilización. La

búsqueda de los COC se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico y una pipeta automática de 10 μ l. Los COC recuperados se transfirieron a cajas petri en gotas de 100 μ l del líquido folicular.

5.1.2. Maduración *in vitro* de ovocitos

Para la maduración de los COC, se prepararon con anticipación cajas petri de 35 mm con gotas de 90 μ l de medio de maduración: TCM199 (GIBCO) suplementado con 6mg/ml de BSA (GIBCO), 0.2 mM de Piruvato, 25mM de bicarbonato de sodio, 75 μ g/ml de kanamicina, 0.5 μ g/ml de FSH (Pluset), 50 μ g/ml de LH (Vetecor), 1.0 μ g/ml estradiol y 0.1 μ l/ml de antioxidante (SIGMA 1000X) (Sa Barreto *et al.*, 2011). Las gotas de medio de maduración se cubrieron con 4 ml de aceite mineral (CORNEL) y se incubaron durante dos 2 horas previas a la introducción de los COC a 38.5°C con 5% CO₂, para que lograran alcanzar la temperatura indicada y para equilibrar el contenido de gases en el medio.

Antes de transferir los COC al medio de maduración, estos se enjuagaron dos veces en líquido folicular centrifugado y una vez más en medio de maduración, con el fin de eliminar los detritus celulares. Se colocaron hasta 25 ovocitos por gota (90 μ l), donde permanecieron durante 24 horas a 38.5°C con 5% de CO₂ (Garcia *et al.*, 2003). Se consideró como un ovocito maduro aquel que mostró expansión de sus células del cúmulo y homogeneidad del ooplasma (Koester *et al.*, 2011).

5.1.3. Fertilización *in vitro* (FIV)

La fertilización de ovocitos se llevó a cabo utilizando semen congelado de un solo toro (GYR) con fertilidad comprobada. La pajilla de semen se descongeló sumergiéndola en agua a 37°C durante 30 segundos. Posteriormente, se secó con papel y se cortó por un extremo para colocar el semen en un tubo eppendorf sobre un gradiente de Percoll. El Percoll fue constituido por 1 ml de Percoll al 90% y 1 ml al 45%, diluido en medio de fertilización (Parrish *et al.*, 1995). El medio de fertilización se compone de Medio TALP (Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate) suplementado con 0.2 mM de piruvato de sodio, 6mg/ml BSA (GIBCO), 25 mM de bicarbonato de sodio, 13 mM de lactato de sodio, 75 μ g/ml de kanamicina, 4.5 μ l/ml de solución PHE (2 mM penicilamina, 1 mM hipotaurina y 250 μ M epinefrina) y 10 μ g/ml de heparina (Sa Barreto *et al.*, 2011).

El Percoll con el semen se centrifugó a 1789 g durante 5 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió con 1 ml de medio de fertilización, centrifugándose nuevamente a 252

g durante 3 min. El sobrenadante se descartó una vez más y del precipitado obtenido se retiraron 30 μl que se mezclaron con 30 μl más de medio FIV, alcanzándose un total de 60 μl . Se extrajeron 5 μl de volumen, para la observación de la motilidad espermática, y otros 5 μl para el conteo espermático, lo que dejó un volumen de 50 μl . Finalmente, con la ayuda de un hematocitómetro, se ajustó la concentración espermática a 2×10^6 espermatozoides/ml añadiendo el medio FIV necesario (Garcia *et al.*, 2003).

Por otro lado, todos los COC madurados, fueron lavados en medio TI semen comercial (Tyrodes Lactate Medium), para después transferirlos a cajas de petri de 35 mm con gotas de 90 μl de medio de fertilización sumergidas en aceite mineral previamente gaseadas. Las gotas se co-incubaron con 8 μl /gota de suspensión del semen durante 18 horas, a 38.5°C con 5% CO_2 (Garcia, 2003) para una concentración final de 1.8×10^5 espermatozoides/ml. Se introdujeron hasta 25 ovocitos por gota.

5.1.4. Cultivo de embriones

Después de la FIV, las células de la granulosa que rodeaban a los presuntos cigotos se removieron mecánicamente mediante pipeteo. Posteriormente, los embriones se enjuagaron en medio SOF comercial (Synthetic Oviductal Fluid, TEGGENE) y se trasladaron a cajas de petri con gotas de 100 μL del mismo medio donde se incubaron durante 60 horas (2.5 días) a 38.5°C con 5% CO_2 . Se introdujeron hasta 25 presuntos cigotos por gota. El medio SOF fue suplementado con 0.2 mM de L-glutamina, 0.34 mM de citrato de sodio, 2.8 mM myoinositol, 2% de MEM aminoácidos esenciales, 1% MEM aminoácidos no esenciales, 0.2 mM de piruvato de sodio, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina, 5 mg/ml de BSA (GIBCO) y 2.5% suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) (Sa Barreto *et al.*, 2011).

Posterior a la incubación los embriones se examinaron con el microscopio estereoscópico para observar su desarrollo. Los embriones de 2 a 4 células se consideraron divididos pero no continuaron con el cultivo, los embriones con más de 6 células se trasladaron a cajas petri nuevas con medio SOF fresco previamente gaseado para su posterior cultivo. El medio se suplementó cada 2 días, removiendo 50 μl de medio y remplazándolo con 50 μl de medio SOF fresco (Garcia *et al.*, 2003). La tasa de desarrollo a blastocistos se evaluó el día 7; las estructuras obtenidas se clasificaron de acuerdo a la International Embryo Transfer Society (IETS, 2012) en:

- Mórulas
- Blastocistos iniciales
- Blastocistos
- Blastocistos expandidos
- Blastocistos en extrusión
- Blastocistos extruidos

La producción de embriones *in vitro* se hizo con el siguiente calendario:

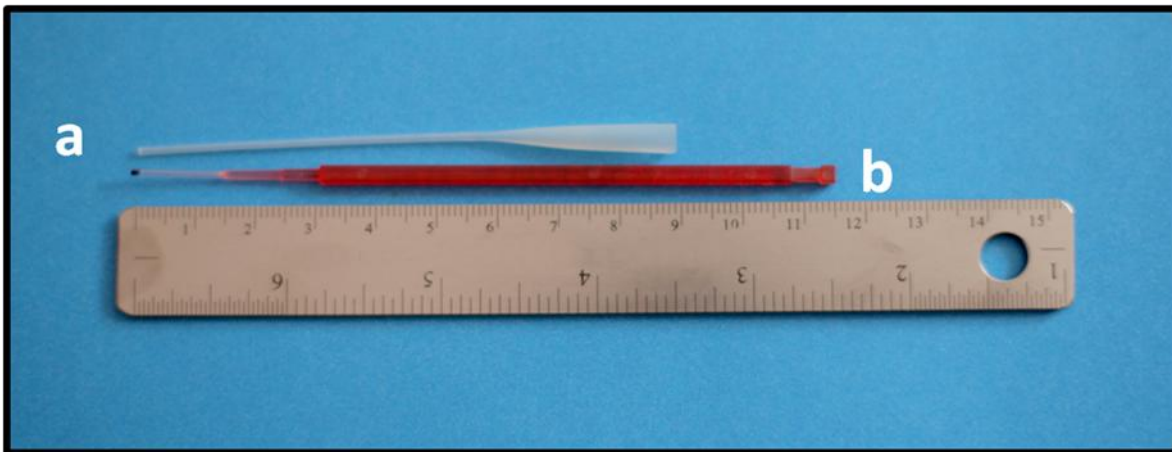
MADURACIÓN	FERTILIZACIÓN	CULTIVO	REVISIÓN DE LA PRIMERA DIVISIÓN	ALIMENTACIÓN	REVISIÓN EMBRIONARIA	VITRIFICACIÓN
DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 4	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8

5.2. Criopreservación

Después de la clasificación embrionaria se procedió a la criopreservación. Se incluyeron a todos aquellos embriones cuyo grado de desarrollo iba de mórula a blastocisto expandido. Se usó el mismo protocolo de vitrificación en todos los embriones, pero dividiendo a la población en dos soportes de criopreservación diferentes: el Cryotop y el “Open Pulled Straw” también llamado capilar (Figura 4). Se procuró que la calidad, grado de desarrollo y número de embriones estuvieran balanceados para cada tipo de soporte.

Para la técnica de OPS, se utilizaron puntas de pipetas de plástico empleadas para transferencias embrionarias (BIONICHE), las cuales se unen a jeringas de insulina para poder aspirar a los embriones con el menor volumen de medio posible. Estas puntas son semejantes a las OPU descritas por Vajta *et al.* (1998). Los cryotop del estudio fueron donados por la clínica de fertilidad INMATER, donde habían sido previamente utilizados para vitrificar embriones humanos, para después ser usados en el estudio presente. Para su uso en el experimento se lavaron en agua destilada en la máquina de ultrasonido y en alcohol y se empleó una estufa de laboratorio para secarlos.

Figura 4. Soportes usados para la vitrificación de embriones: a. Capilar OPS y b. Cryotop



Para la vitrificación se usó el protocolo desarrollado por el Instituto Mexicano de Alta Tecnología Reproductiva (INMATER, México, DF. Lazcano *et al.*, 2010), basado en las técnicas de vitrificación del instituto Japonés Kuwayama (Chian *et al.*, 2004). Se utilizan las siguientes soluciones fabricadas en el laboratorio un día antes:

- Solución de Lavado (WS)= Medio de lavado HEPES (Irvine Scientific) + 0.2 ml/ml SFB.
- Solución de equilibrio (ES)= Medio de lavado HEPES + 0.2 ml/ml SFB + 2.5 M de etilen glicol (7.5%) y 2 M de 1,2- propanodiol (7.5%).
- Solución de vitrificación (VS)= Medio de lavado HEPES + 20% de SFB + 5 M de etilenglicol (15%) y 4 M de 1, 2- propanodiol (15%) + 0.5 M de sucrosa
- Solución de desvitrificación (TS)= Medio de lavado HEPES + 20% SFB + 1M de sucrosa

Antes de iniciar el proceso de vitrificación, los medios se dejaron a temperatura ambiente durante 5-10 min, colocando en una caja de petri de 55 mm, una gota de 30 μ l de solución WS y 3 gotas de 30 μ l de solución ES. Con ayuda de una pipeta automática, los embriones se transfirieron a la superficie de la solución WS, dejándolos hundir hasta tocar el fondo durante 30 segundos. Al pasar este tiempo, se creó un puente entre la gota WS y la gota más cercana de ES utilizando la punta de la pipeta, dejándolo así durante 3 min. Posteriormente, se creó otro puente con otra gota de ES, dejando las tres gotas juntas durante otros 3 minutos. Al final de este tiempo, los embriones se trasladaron a una cuarta gota de 30 μ l de ES, durante 9 minutos. Por último, los embriones se transfirieron a otra caja con 3 ml de medio VS durante 45 seg a 1 min (Figura 5).

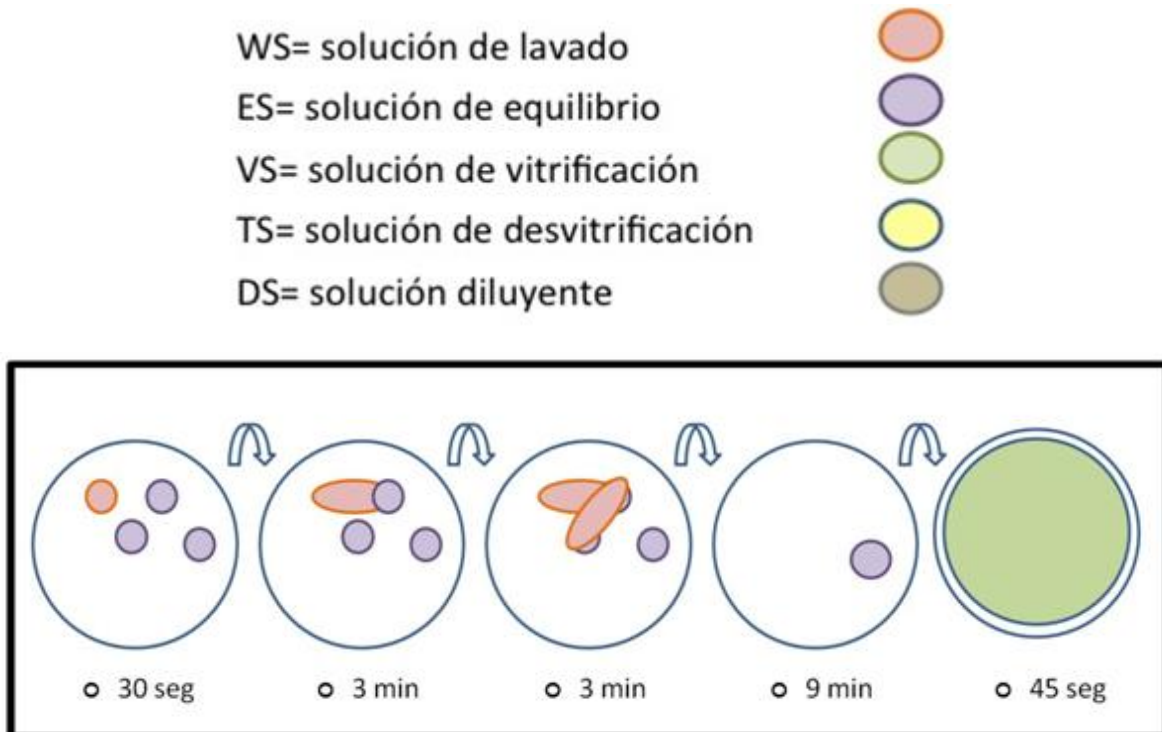
Una vez que hubieron pasado por los medios y las diferentes concentraciones de crioprotectores, los embriones se colocaron en los dos diferentes tipos de soportes previamente etiquetados:

- a. OPS: Los embriones se colocaron en una caja nueva con un volúmen de medio no mayor a 1 μl , y ya sea por capilaridad o con ayuda de una jeringa de insulina, se introdujeron a la punta de la pipeta de plástico.
- b. Cryotop: Los embriones se colocaron en la punta del cryotop con la ayuda de una pipeta capilar de vidrio con un volúmen aproximado de 0.1 μl .

Entre los dos soportes existe una diferencia de volumen de medio donde se coloca la muestra de 0.1 a 1 μl (Vajta *et al.*, 1998; Kuwayama, 2007).

El soporte con los embriones se introdujo rápidamente en el nitrógeno líquido (N_2) haciendo movimientos laterales para aumentar la velocidad de vitrificación y evitar los vapores del N_2 . Finalmente, los soportes se transfirieron y almacenaron a -196°C en un tanque N_2L .

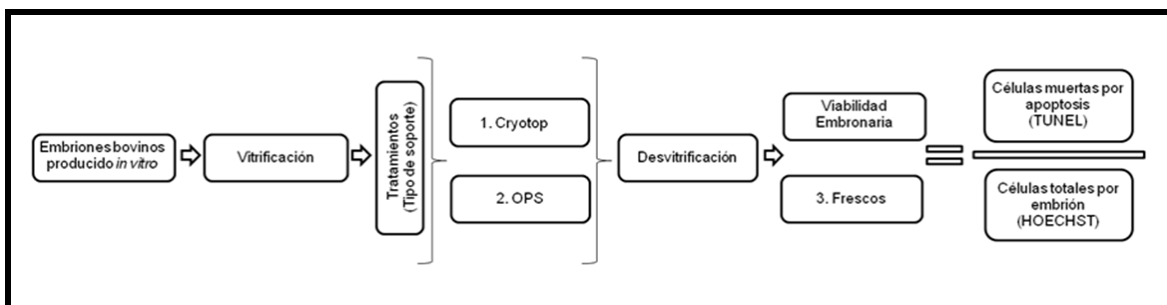
Figura 5. Esquema del proceso utilizado para la vitrificación de embriones bovinos.



5.3. Diseño Experimental

Los embriones bovinos producidos *in vitro* se clasificaron por estadio de desarrollo y calidad el día 8 post vitrificación. Se vitrificaron sólo los embriones a partir del estadio de mórulas con calidad 1 y 2 y se distribuyeron de acuerdo al tipo de soporte: Cryotop y OPS. Además, por cada lote de embriones producidos, se tomaron de 5 a 8 embriones frescos, para usarlos como testigo sin vitrificar. Posterior a la desvitrificación solo se pudieron recuperar 292 debido al desprendimiento de los mismos de sus soportes de vitrificación. Una vez desvitrificados los embriones se consideró únicamente el tipo de soporte en el que se vitrificaron para el análisis, sin tomar en cuenta el grado de desarrollo ni la calidad. A los embriones recuperados post desvitrificación, se les marcó para la identificación de células apoptóticas con TUNEL y después con Hoechst para la identificación de las células totales. De este procedimiento se obtuvieron resultados de viabilidad de 165 embriones, ya que algunos se perdieron en el medio o estallaron por la manipulación hecha durante el proceso. Se fotografió embrión por embrión (40X) después de cada tinción para realizar el conteo celular y hacer un registro para el análisis estadístico.

Figura 6. Diseño experimental



En este estudio, los embriones bovinos producidos *in vitro* se vitrificaron al día 8 de desarrollo, y se dividieron en dos tipos de soporte diferentes: cryotop y OPS. Al ser desvitrificados se evaluó la viabilidad embrionaria, teniendo como grupo testigo a embriones frescos. La relación entre el número de células positivas a apoptosis y el número de células totales en el embrión se determinó después de de realizar las tinciones de TUNEL y de Hoechst respectivamente y al porcentaje obtenido. La relación entre el número de células apoptóticas y el número total de células del embrión fue considerada como la “viabilidad embrionaria”. Entendiéndose que a menor porcentaje de células positivas a apoptosis existe una mayor viabilidad.

5.4. EVALUACIÓN DE DAÑO CELULAR POST-CRIOPRESERVACIÓN

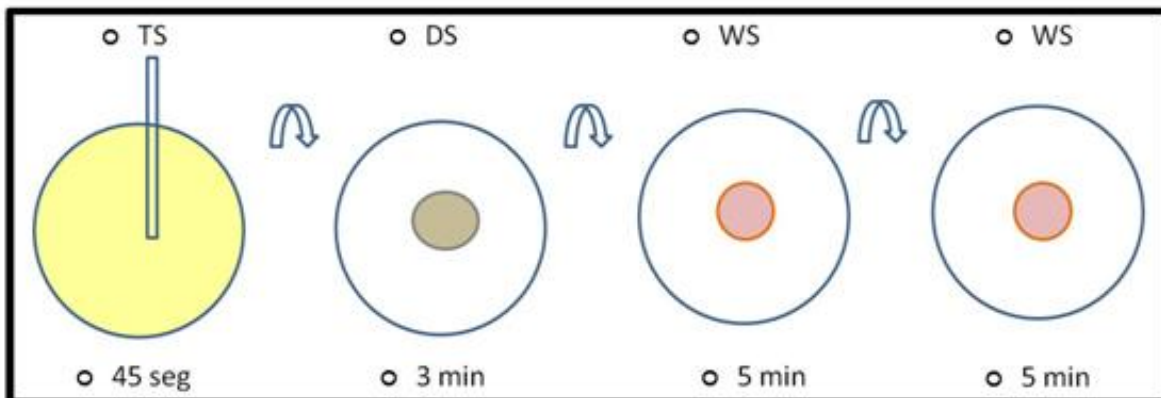
5.4.1. Desvitrificación

Para desvitrificar a los embriones, se sacó el soporte lo más rápido posible del tanque de nitrógeno líquido y se siguieron los pasos A ó B dependiendo de si se trataba de un OPS o de un cryotop, según el protocolo de Lazcano *et al.*, (2010) (Figura 7):

- OPS: Se colocó la mayor parte posible del capilar dentro de una caja petri con 5 ml solución TS a 37°C hasta que los embriones se desprendieran. Si los embriones no salían, se cargó una jeringa de insulina con 0.5 ml de medio TS y se deslizó a través del capilar hacia la caja de petri con 5 ml de medio TS para expeler al embrión.
- Cryotop: La punta del filamento se colocó dentro de una caja petri con 5ml de solución TS a 37°C sin moverlo hasta que se desprendieron los embriones.

Para constatar que los embriones se hubieran desprendido del soporte se observó todo el proceso bajo el microscopio estereoscópico. Una vez en el medio, los embriones se dejaron en la caja de petri con 5 ml de solución TS por 45 seg a 1 min. Posteriormente, los embriones se transfirieron a una gota de 30 μ l de solución WS durante 5 min; este último paso se repitió una vez más. Al finalizar la desvitrificación, se prosiguió con las técnicas de marcaje celular, las cuales permitieron evaluar la relación entre el número de células con daño en el ADN y el número de células totales dentro del embrión.

Figura 7: Esquema del proceso utilizado para la desvitrificación de embriones bovinos



5.4.2. Marcaje para evaluar células con daños en ADN dentro del embrión

Para poder determinar la cantidad de células no viables dentro del embrión se empleó la técnica de TUNEL. Los embriones en estado degenerativo tienen un mayor número de células apoptóticas, por lo que muestran una mayor tinción (Fear y Hansen, 2011). El marcaje con TUNEL se realizó mediante la metodología descrita previamente (Paula-Lopes *et al.*, 2001; Godínez, 2009; Fear y Hansen, 2011), con algunas modificaciones y de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el estuche comercial TUNEL AP (ROCHE Diagnostics kit, USA).

Brevemente, los embriones se dejaron incubar 1 hr a 37°C en 100 µl de la “solución de reacción” de TUNEL, la cual se hizo diluyendo la “solución enzimática” con la “solución de marcaje” incluidas en el kit. Después, se siguieron diferentes procesos para el testigo positivo, el negativo o el resto de los embriones. Para el testigo negativo, los embriones se incubaron en presencia de la solución de marcaje sin enzima. Para el testigo positivo los embriones se introdujeron en un medio con ADNasa (1000 UI) durante 15 min a temperatura ambiente, con el fin de inducir el rompimiento de las hebras de ADN y forzar el marcaje. Posteriormente, se volvió a unificar el protocolo para los tres grupos y los embriones se introdujeron en la “solución de reacción” durante 60 minutos a 37°C en condiciones de obscuridad, donde las hebras de ADN rotas fueron marcadas con el fluorocromo AP (Alkaline Phosphatase) en color verde. Una vez, de finalizado el marcaje de TUNEL, los embriones se colocaron en gotas de 20 µl de solución PBS+BSA y se observaron bajo el microscopio con un filtro de fluorescencia B2A para el conteo de núcleos positivos, distinguiéndolos por su fluorescencia en color verde. Para el registro, se tomó una foto de cada embrión con una cámara integrada al microscopio a 40 X.

5.4.3. Marcaje para evaluar la cantidad de células totales dentro de un embrión

Después del marcaje con la técnica de TUNEL, se realizó otro con la tinción de Hoechst (SIGMA B2261) para determinar el número total de células del embrión, basándose en el protocolo descrito por Moreira *et al.* (2001). Brevemente, los embriones se lavaron con una solución de PBS+BSA para posteriormente ser transferidos a una gota de 50 µl de solución de trabajo (1µg/ml de Hoechst), donde permanecieron durante 10 min a temperatura ambiente en total oscuridad. Finalmente, se realizó un lavado con PBS+BSA y se procedió al montaje en laminillas su observación en el microscopio (10X, 20X y 40X) con el filtro UV/2A y el conteo de núcleos positivos, los cuales fluorescen en color azul con este marcador celular.

5.4.4. Montaje de embriones y observación al microscopio

Después de los marcajes celulares, se realizó una última observación de los embriones bajo el microscopio, NIKON ECLIPSE TE300 con filtros de fluorescencia B2A, UV y G-2E. Este montaje se hizo en laminillas con poli-L-lisina, a las cuales se le transfirieron los embriones en gotas individuales con un volumen mínimo (2 μ l). El área donde se posicionó el embrión se marcó con un plumón, después se colocó un cubreobjetos para hacer un conteo celular y tomar una última fotografía del embrión (40X) con la cámara integrada al microscopio. Para poder almacenar las laminillas con los embriones se les añadieron entre 2 y 16 μ l de solución anti desvaneciente (ProLong Antifade Kit; Molecular Probes P-7481). Las laminillas se cubrieron y se dejaron secar en un cuarto oscuro para posteriormente almacenarlas a -2°C.

5.5. Análisis estadístico

El efecto de los soportes (OPS y Cryotop) sobre la proporción de células en apoptosis en relación a las células totales (viabilidad), fue analizado usando regresión logística con la ayuda del programa Genstat 14th. El total de los embriones recuperados post desvitrificados fueron incluidos en el análisis. Se realizó una transformación logística (Logit) de la variable células con daño celular/total de células, para evaluar el efecto del soporte sobre la viabilidad del embrión. Posterior al análisis, ésta variable fue transformada a su escala original (numérica) para presentar la relación de presencia de apoptosis/células totales; los datos se presentan como porcentajes \pm error estándar (e.e).

El número de células totales de los embriones en los diferentes grupos se analizó mediante un ANOVA y los resultados se muestran como media \pm e.e. Por último, el porcentaje de embriones perdidos por tipo de soporte se analizó mediante X^2 .

El nivel de significancia estadística para las pruebas se fijó a priori en $P < 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1. Vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*

En la figura 8 se muestran embriones en diferentes etapas de desarrollo, para ejemplificar la clasificación utilizada en el experimento:

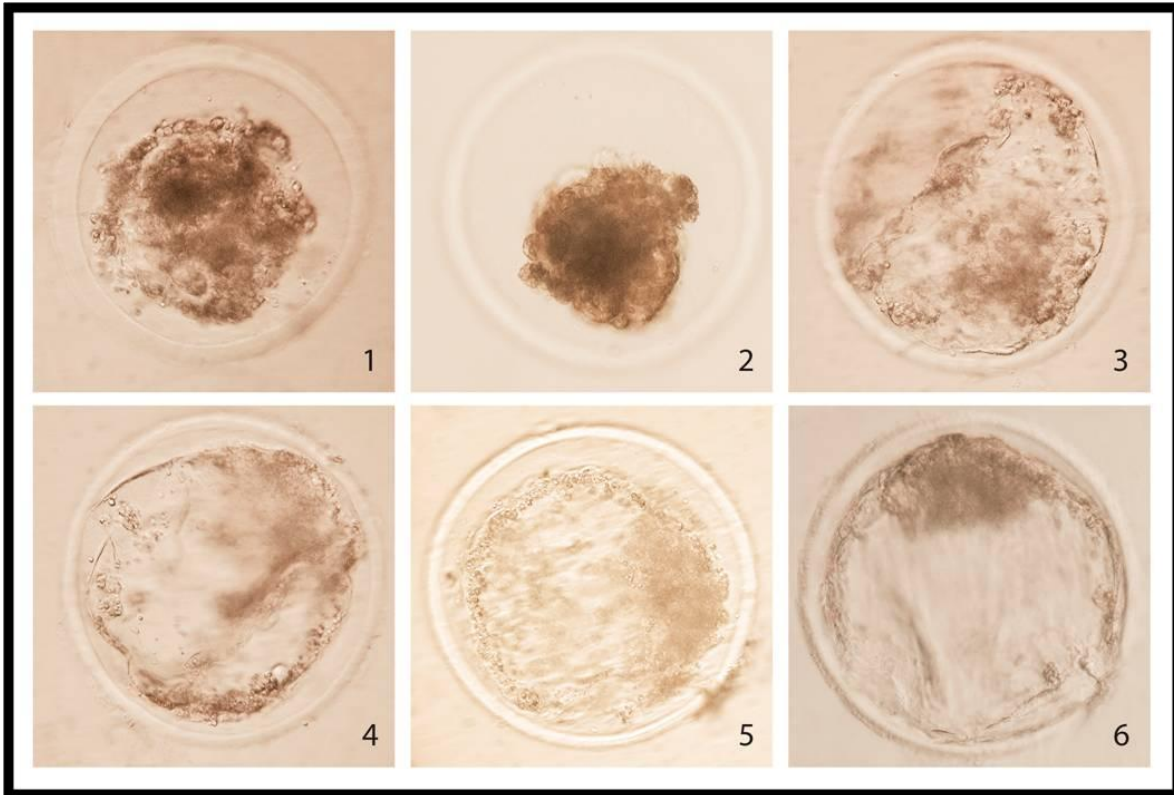


Figura 8. Ejemplificación de estadios embrionarios para la clasificación de embriones producidos *in vitro*, vitrificados y desvitrificados, donde: 1. Mórula, 2. Mórula compacta, 3. Blastocisto inicial, 4. Blastocisto, 5. Blastocisto, 6. Blastocisto expandido.

Se realizaron 5 corridas de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de embriones de los cuales se obtuvieron 478 embriones que fueron distribuidos en los grupos como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación embrionaria y división por tipo de soporte (Cryotop y OPS) de embriones bovinos producidos *in vitro*, vitrificados y usados para la realización de las técnicas de marcaje.

SOPORTE/CLASIFICACIÓN	B expandido	Blastocisto	B inicial	Mórula	TOTALES
Cryotop	13	65	95	64	237
OPS	16	65	76	47	204
Frescos	6	15	12	4	37
TOTALES	35	145	183	115	478

6.2. Desvitrificación de Embriones Bovinos Producidos *In vitro*

Para evaluar el número de células positivas a TUNEL y Hoechst, se usaron 478 embriones, de los cuales 441 eran embriones vitrificados y 37 frescos. Posterior a la vitrificación no se registró a los embriones por su grado de desarrollo. En el cuadro 4 se muestra el número de embriones vitrificados y el número de embriones que se recuperaron después de su desvitrificación de acuerdo al tipo de soporte, se recuperó el 64% de los embriones para obtener un total de 165. El porcentaje de embriones recuperados fue 34 puntos porcentuales menores cuando el soporte de vitrificación utilizado fue el cryotop comparado con el OPS ($P < 0.001$).

Cuadro 4. Total de embriones bovinos según tratamiento, contra total de embriones recuperados post-desvitrificación y número de embriones evaluados para viabilidad por tratamiento.

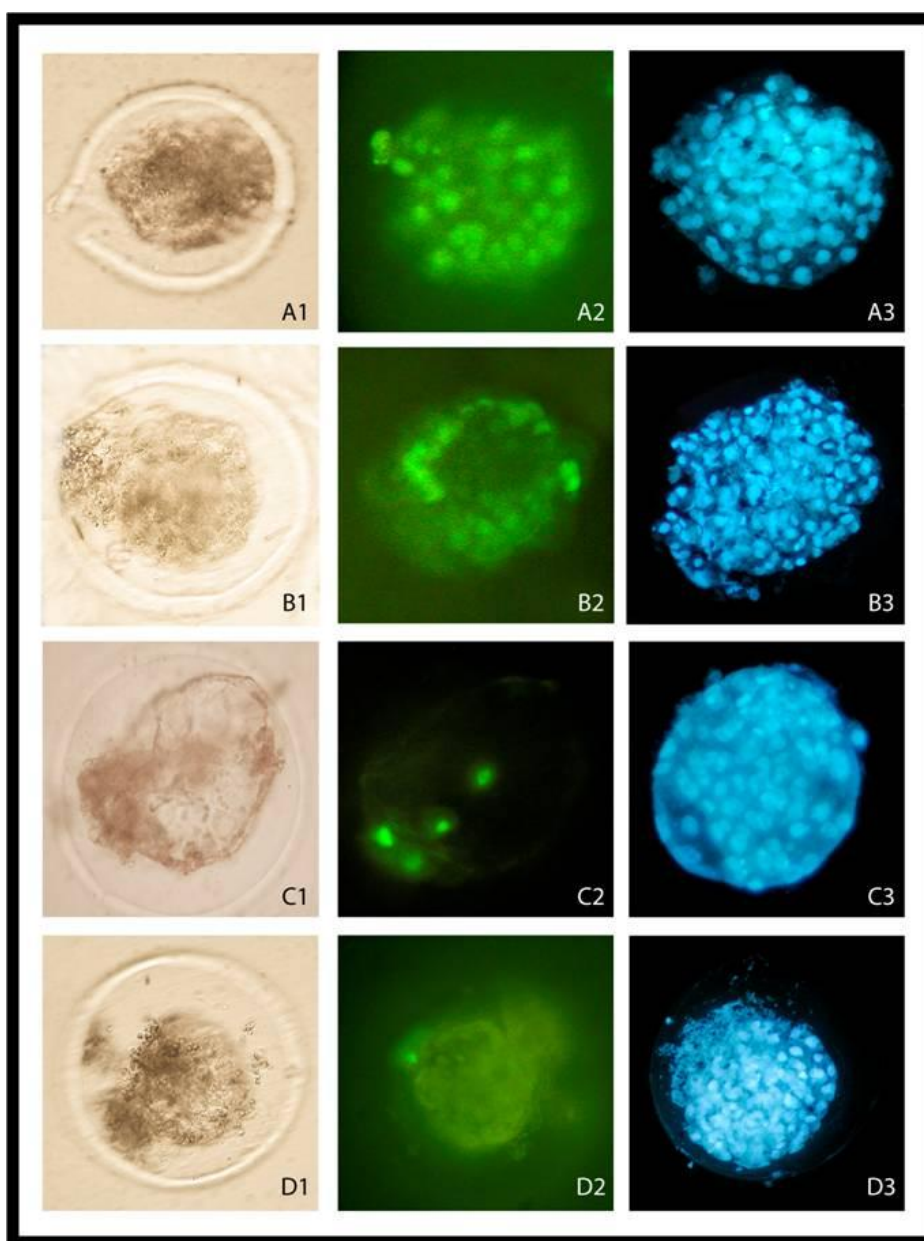
SOPORTE	Iniciales	Recuperados	% Recuperación	Utilizados para evaluación viabilidad
Cryotop	237	120	50.63 ^a	63
OPS	204	172	84.31 ^b	65
Frescos	37	37	100 ^c	37
TOTALES	478	329	66.21	165

Diferente literal en la misma columna indica diferencia entre grupos $P < 0.001$.

6.3. Conteo celular y viabilidad embrionaria

Los testigos positivos a la prueba de TUNEL mostraron todas sus células marcadas después de ser expuestos a la ADNasa. En contraste, los controles negativos, al no estar expuestos a la enzima (transferasa terminal), no presentaron fluorescencia específica. En la prueba de Hoechst todas las células del embrión fueron teñidas en color azul. En la Figura 9 se muestran algunas fotos de embriones teñidos por ambos marcajes celulares:

Figura 9. Embriones desvitrificados y teñidos para distinguir daño en el ADN (TUNEL) y células totales (Hoechst).



La figura 9 ejemplifica embriones con diferente grado de daño celular. La fila A representa a un embrión con muchas células apoptóticas, las filas B, C, D, muestran como el daño celular disminuye, lo que se aprecia por el decremento de células positivas al marcaje de TUNEL. En la columna 1 se observa al embrión desde un microscopio óptico, la columna dos muestra las células con daños en el ADN marcadas con TUNEL, la columna 3 muestra el número total de células teñidas con Hoechst.

El número promedio de células totales por embrión al día 8 de su desarrollo no difirió entre tratamientos (58.73 ± 2.47 ; $P > 0.05$). El Cuadro 5 muestra la proporción de células apoptóticas (células positivas a TUNEL) sobre el número total de células de los embriones (núcleos positivos a Hoechst) de acuerdo al tipo de soporte en el que fueron vitrificados y su comparación con los embriones frescos. La proporción de células apoptóticas en los embriones frescos fue de $7.8 \pm 1.8\%$, mientras que se aumentó con los procesos de vitrificación y desvitrificación en ambos soportes (22.22 ± 2.3 y 40.62 ± 2.7 , para el cryotop y el OPS respectivamente; $P < 0.001$). Dicha proporción, fue casi el doble para los embriones vitrificados en OPS que para los vitrificados en cryotop ($P < 0.001$).

Cuadro 5. Número de células totales y proporción de células apoptóticas (media \pm e.e) sobre el número total de células (media \pm e.e) X 100 de embriones frescos y vitrificados de acuerdo al tipo de soporte (OPS o Cryotop).

SOPORTE/ No. Células	N	Relación (%) Células apoptóticas/células totales	No. Células Totales
Frescos	37	7.8 ± 1.8^a	69.59 ± 5.15^a
Cryotop	63	22.22 ± 2.3^b	56.29 ± 3.95^a
OPS	65	40.62 ± 2.7^c	54.87 ± 3.91^a

Diferentes literales en la misma columna indican diferencia estadística ($P < 0.001$).

VII. DISCUSIÓN

En este estudio se comparó el daño post-desvitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* y vitrificados en dos tipos de soportes: el cryotop y el OPS. Los embriones vitrificados mediante el soporte cryotop mostraron menor daño post-desvitrificación al presentar menor proporción de células positivas a TUNEL sobre células totales que los embriones vitrificados mediante OPS, $22.22\% \pm 2.3$ y $40.62\% \pm 2.7$; $P < 0.001$, respectivamente. El sistema OPS presentó una mejor recuperación embrionaria al momento de desvitrificación que el sistema cryotop cuando los soportes son reutilizados. Los resultados del presente estudio sugieren que el cryotop es un mejor soporte de vitrificación para embriones bovinos al presentar menor cantidad de células apoptóticas post desvitrificación que el OPS.

Cuando se comparan embriones frescos vs. vitrificados se muestra que la criopreservación repercute en el nivel de muerte celular de un embrión ya que embriones congelados presentan mayor incidencia de células positivas a TUNEL (Rubio-Pomar *et al.*, 2005) De igual manera, Márquez (2003) al comparar embriones frescos y congelados comprueba que entre mayor sea la incidencia de células muertas dentro del embrión su capacidad de supervivencia se va a ver deteriorada. Más aún, la tasa de gestación al transferir embriones frescos vs. vitrificados disminuye hasta en un 20% en éstos últimos (Aghsa *et al.*, 1998; Al-Katanani *et al.*, 2002). En éste estudio, los embriones vitrificados, sin considerar el tipo de soporte empleado, tuvieron mayor daño celular que los embriones que no fueron congelados, mostrando estos últimos, una proporción de células positivas a TUNEL sobre células totales por embrión (8% frescos vs. 20% en los vitrificados). Lo anterior concuerda con observaciones previas en las que los embriones que son criopreservados sufren daños tanto morfológicos como funcionales durante su congelación, los cuales impactan en su posterior viabilidad (Morató *et al.*, 2008).

Un estudio comparativo de Hung y Chow (2010) entre los soportes mayormente usados para vitrificar ovocitos o embriones y su porcentaje de supervivencia post-desvitrificación mostró una alta variabilidad en el porcentaje de embriones viables (entre 50 y 100%), indicando en todos los casos, la existencia de daños o pérdidas embrionarias a causa del proceso de criopreservación (Bagis *et al.*, 2004; Dhali *et al.*, 2009; Kuwayama *et al.*, 2005; Sudano *et al.*, 2012), además también muestran una merma entre los embriones que se vitrifican contra los que se logran transferir (Tsang y Chow, 2010). En ese estudio, se pudo observar que los soportes como la malla (Martino

et al.,1996), el criotubo (Bagis *et al.*,2004), el OPS (Vajta *et al.*,1998), el cryoloop (Lane y Gardner, 2001), el cryotop (Kuwayama *et al.*,2005) y la espátula (Tsang y Chow, 2009), entre otros, muestran una variación significativa en la supervivencia embrionaria post-vitrificación (Tsang y Chow, 2010). Además, en ese mismo estudio, Tsang y Chow (2010), muestran que en embriones bovinos al usar OPS o Cryotop, el último presenta hasta 7% más supervivencia embrionaria y Vajta *et al.* (1998), muestran que se puede lograr hasta 16% más gestaciones. Por otro lado, al comparar al OPS contra el Cryotop entre diferentes especies animales de embriones u ovocitos, el OPS presenta hasta el 100% de viabilidad al usarlo en ratones (Chen *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2010) mientras que en la especie bovina la viabilidad varía del 25% hasta el 90% (Vajta *et al.*, 1998; Hung y Chow, 2010). Para el soporte cryotop, su uso en humanos llega hasta la obtención del 100% de embriones viables y en bovino hasta de 97% (Kuwayama *et al.*, 2005; Kuwayama *et al.*, 2005).

En otros estudios en los que se comparan el OPS o el cryotop contra otro tipo de soporte como son el OPS vs micro gota en ovocitos bovinos (Báez-Contreras *et al.*, 2009), OPS vs. cryoloop en embriones de yegua y vacas (Oberstein *et al.*, 2001; Hurtt *et al.*, 2000) se observa que, tal y como ocurre en el presente estudio, el sistema de vitrificación diferente al OPS mostró una diferencia positiva en la viabilidad embrionaria post vitrificación. Por el contrario, cuando se compara el cryotop como tipo de soporte contra otros métodos, como el cryotop vs cryolook en embriones humanos (Lazcano *et al.*, 2010), cryotop vs. superficie sólida de vitrificación en ovocitos bovinos (Sripunya *et al.*, 2010), cryotop vs. micro gota en embriones de búfalo (Liang y Parnpai, 2010) u OPS vs. cryotop en ovocitos bovinos (Morató *et al.*, 2008), éste último es igual o superior a otros soportes en cuanto a la viabilidad post-criopreservación de los embriones. En estos estudios, se les atribuye una mejor viabilidad embrionaria post- desvitrificación a los soportes que presentan materiales de fabricación con mayor conducción de calor y soportes que permiten una cantidad de volumen mínima, factores que permiten una mejor velocidad de enfriamiento y menores daños celulares (Kong *et al.*, 2000; Cremades *et al.*, 2004; Kuwayama, 2005; Morató *et al.*, 2008; Sripunya, 2010). Aún con estos reportes, en el que el cryotop muestra ser uno de los soportes más recomendables y el OPS es superado por muchos otros soportes, los laboratorios comerciales, aún siguen utilizando el método de OPS o la congelación convencional como parte de su rutina (Mahmoud *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2010). Esto se debe a factores como son las habilidades del embriólogo, ya que este es de los soportes que presentan mayor facilidad para cargar dentro del mismo a los embriones (Sripunya *et al.*, 2010), tienen un mínimo contacto directo con N₂L por lo

que presenta una mayor protección contra contaminación (Kuwayama, 2007) además de ocupar poco espacio de almacén (Cobo *et al.*, 2008).

El aumentar o disminuir la velocidad de enfriamiento en los embriones ocasiona diferentes resultados. Una velocidad de enfriamiento lenta en una célula permite equilibrio con el medio extracelular (Capalbo *et al.*, 2011), provocando que la formación de cristales suceda extracelularmente y que éstos cristales le ocasionen un daño directo a la célula (Mazur, 1995). Mientras que una velocidad de enfriamiento rápida no alcanza ese equilibrio, y es tan acelerada que el estado viscoso que forma no alcanza a formar cristales. Estudios realizados donde se han medido las velocidades de enfriamiento en diferentes soportes como cryoloop, OPS, mallas para microscopía electrónica y cryotop (Leibo y Loskutoff, 1993; Vajta *et al.*, 1996; Martino *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1999; Kuwayama *et al.*, 2005) muestran una mayor viabilidad embrionaria en soportes que permiten una aceleración en la velocidad de enfriamiento. Existen diferentes variables que se pueden alterar con el propósito de aumentar la velocidad a la que se enfrían a los embriones como: la concentración y mezcla de crioprotectores que se usen, el tipo de soporte empleado y sobre todo el volumen de solución en el que se congela la muestra. Así, la diferencia en la velocidad de enfriamiento y por ende en la viabilidad embrionaria entre el OPS y el cryotop obtenidos en este estudio, pueden haber sido resultado de una combinación de estos dos últimos factores.

El volumen de solución en el que los embriones son vitrificados cambia considerablemente la velocidad de enfriamiento y calentamiento. En un estudio se observó que la velocidad al enfriar una muestra en 2 μl o en 0.2 μl de solución cambia de 30000°C a 180000°C/min, lo que demuestra como una mínima cantidad como 1.8 μl puede tener grandes repercusiones en la velocidad de enfriamiento y consecuentemente en la supervivencia de los embriones (Martino *et al.*, 1996). En la criopreservación lenta o de equilibrio, el volumen de solución dentro de la pajilla en el cual se encuentra el embrión al congelar la muestra es de 5 μl , con ese volumen se obtenía una velocidad de enfriamiento lenta (<200°C/min) (Thompson *et al.*, 2011, Saragusty y Arav, 2011). Con el fin de incrementar la velocidad de enfriamiento (Vajta *et al.*, 1998) y lograr la vitrificación, el volumen, en el método de OPS, se redujo a 1-1.5 μl (Kuwayama *et al.*, 2005). Estudios en los que se ha medido la velocidad de enfriamiento de este método demuestran que con el OPS se obtiene una velocidades de enfriamiento de 25000°C/min (Chang, 2006). Al usar el soporte tipo cryotop, esta diferencia de velocidad de enfriamiento se ve aún más pronunciada, ya que el volumen en el cual

se vitrifican los embriones mediante el cryotop disminuye hasta $<0.1\mu\text{l}$ lo que logra aumentar la velocidad de la enfriamiento hasta $42000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ según estudios realizados por Cobo *et al.*, (2008). Al producirse un estado viscoso más rápidamente en el medio celular y disminuir aún más la formación de cristales dentro del embrión, se genera menor daño celular, por lo cual esta podría ser la razón por la que el método de cryotop en este estudio muestra mayor número de células viables que los embriones vitrificados mediante OPS.

El tipo de material con el cual está fabricado el soporte es una variable más que modifica la velocidad de enfriamiento y por lo tanto impacta en la viabilidad embrionaria (Tsang y Chow, 2009). La velocidad de enfriamiento depende de la facilidad de conducción de calor que presenta el soporte (Morató *et al.*, 2008). En el método de OPS realizado en este estudio, se emplearon catéteres para manipulación de embriones FIV de plástico, mientras que el método de cryotop, es una superficie de polipropileno. El polipropileno, es resistente al agua, es moldeable y además es un material adherente hecho a base de materiales de olefina (propileno+etileno) (Volkening, 2000), componentes que lo hacen muy buen conductor de calor ($0.42\text{-}0.51\text{ W/mK}$) (Chang, 2006; Engineeringtoolbox, 2011). Los catéteres FIV usados para el OPS, están hechos a base de plásticos no tóxicos de poliuretano, que presentan una conductividad aproximada de 0.02 W/mK (Engineeringtoolbox, 2011), la cual es mucho menor que la del polipropileno (Weidenfeller *et al.*, 2004; Engineeringtoolbox, 2011) Por lo anterior, la conductividad de calor entre los materiales utilizados pudo causar diferencias en la velocidad de enfriamiento, siendo más veloz en el cryotop. A causa de esto, embriones vitrificados por el método OPS donde el volumen es mayor y tienen un material menos conductivo presentan una menor viabilidad que embriones vitrificados mediante cryotop, dónde el material del soporte es altamente conductivo y volumen de muestra es tan pequeño que permite maximizar la velocidad de enfriamiento, reduciendo así los daños embrionarios y con esto mejorando la viabilidad al presentar menos cantidad de células apoptóticas durante su análisis. Lo anterior explicaría los resultados del presente trabajo en los que la viabilidad fue mayor cuando se utilizó el cryotop.

Existen diferentes métodos que ayudan a evaluar la calidad de un embrión posterior a manipulaciones como el cultivo *in vitro* y la criopreservación. El método más comúnmente usado es la evaluación morfológica bajo el microscopio (Hiroyuki e Hiroshi, 2003; Spell *et al.*, 2001); sin embargo como lo señalan Farin *et al.* (1995) en un estudio, este tipo de evaluación es muy subjetiva (Báez-Contreras *et al.*, 2009). También es común evaluar a los embriones post-

criopreservación mediante un periodo de cultivo para después evaluar el porcentaje de blastocistos que expanden y/o eclosionan (Yeoman *et al.*, 2001; Cremades *et al.*, 2004; De Rosa, 2007). Sin embargo, un embrión tendrá capacidad de crecimiento y expansión aunque éste haya sufrido daños celulares, para fines de éste estudio, se decidió emplear técnicas las cuales nos pudieran proporcionar la cuantificación del daño celular que se infringe a los embriones al ser vitrificados y además usar una técnica que asegurara resultados para la repetitividad de las pruebas a pesar de ser invasivas. Uno de los métodos más usados para este propósito son los marcajes o tinciones vitales de células vivas o muertas (Schilling *et al.*, 1997; Lane y Gardner, 2001; Moreira *et al.*, 2001; Márquez *et al.*, 2004; Godínez, 2009). Este tipo de marcadores celulares, permiten calificar el desarrollo embrionario mediante conteos de células y por lo tanto arrojan resultados más confiables.

En el presente estudio, se evaluó el grado de viabilidad embrionaria post-desvitrificación mediante el conteo de células con muerte celular en relación al número de células totales dentro del embrión. La tinción de Hoechst, se emplea para identificar los núcleos de células o tejidos vivos o previamente fijados. En el caso de los embriones, Hoechst se encarga de teñir el total de las células y al combinarla con TUNEL, que mide el número de células con daño en el ADN, se puede calcular la proporción de células muertas que se tiene por embrión. La combinación de éstas tinciones vitales permitieron evaluar el daño celular infringido post-desvitrificación de los embriones de manera objetiva entre los soportes tipo cryotop y OPS.

Estudios previos han evaluado en repetidas ocasiones el daño embrionario con TUNEL obteniendo buenos resultados (Byrne *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2001; Rubio-Pomar *et al.*, 2005; Godínez, 2009). Además, estudios que comparan daño embrionario entre embriones frescos y congelados (Pereira y Marques, 2008; Sudano *et al.*, 2012) exponen que los embriones vitrificados presentan muerte celular y daños parecidos a los que se ven durante la apoptosis (Park *et al.*, 2000), mostrando que la formación de cristales y el choque osmótico causan rompimiento del ADN al lesionar directamente a las células (Li *et al.*, 2012). También, estudios demuestran que TUNEL genera en gran proporción falsos positivos dentro de un embrión con células que se encuentran en necrosis (Hardy, 1999; Gjorret *et al.*, 2003; Makarevich y Markkula., 2002). Ambos hallazgos demuestran cómo el marcaje vital con TUNEL brinda la posibilidad de evaluar el grado de muerte celular más completo dentro de un embrión ocasionada por daños o efectos de la vitrificación. Además de los daños causados por efectos de la

criopreservación, los embriones por sí solos presentan apoptosis desde que adquieren 8 células (Vandaele *et al.*, 2007, Gjorret *et al.*, 2003) pasando al estado de mórula y su compactación hasta la implantación del blastocisto en extrusión (Hardy, 1999; Gjorret. *et al.*, 2003; Opiela, 2009). De hecho, algunos estudios han demostrado como inclusive el blastocisto más apto, tiene al menos una célula apoptótica (Vandaele *et al.*, 2007; Gjorret *et al.*, 2003); por lo tanto, si un embrión ha pasado por circunstancias que le ocasionen algún daño o generen estrés como es el caso de la criopreservación, la incidencia de apoptosis será mayor (Hardy, 1999; Opiela, 2009). Los resultados que aquí se muestran ejemplifican cómo todos los embriones sufren algún grado de apoptosis ya que los embriones frescos presentaron células positivas a TUNEL (promediando 8%). También se comprueba cómo la congelación merma el número de células embrionarias al producir muerte celular que varió entre el 22 y el 44% entre los soportes usados.

En este estudio, uno de los puntos claves en la diferencia entre soportes, fue la pérdida de embriones al momento de la desvitrificación. Del total de embriones vitrificados (478) tan sólo se recuperó el 66% (329), lo que representa una pérdida significativa al considerar emplear este método como rutina en el laboratorio. Esta pérdida de embriones difirió entre el tipo de soporte usado: para el tipo de soporte cryotop, se comenzó con un total de 237 embriones y al momento de desvitrificarlos tan sólo se recuperaron 120, lo que representa el 51%, indicando que por éste método se está perdiendo casi la mitad de los embriones que se vitrifican. Para el soporte tipo OPS, la pérdida fue menor, ya que de los 204 embriones congelados, 172 fueron recuperados, recobrando así hasta un 84% de los embriones. En dos estudios previos se mencionan pérdidas embrionarias a causa del soporte: en el primero, Tsang y Chow (2009) criopreservaron embriones de ratón por los métodos de espátula de vitrificación y micropipetas, y en el segundo Sripunya *et al.* (2010) emplearon cryotop vs SSV en ovocitos ovinos, observándose que el método de micropipetas y el de SSV ocasionaban una pérdida de embriones debido a que la gota de vitrificación se adhería a la pared interna del soporte. Sin embargo, existen reportes donde se muestra una recuperación de embriones del 100% tanto en soportes tipo OPS (Chen *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005) como en cryotop (Morató *et al.*, 2010; Sripunya *et al.*, 2010; Inaba *et al.*, 2011), lo que implica que la pérdida embrionaria no es necesariamente a causa del soporte usado durante la desvitrificación.

Una diferencia importante de mencionar entre los tipos de soportes empleados en este estudio es que los soportes tipo Cryotop eran reusados a diferencia de los OPS que eran nuevos. Las proteínas son componentes claves para el cultivo y manipulación de embriones *in vitro* (Blake *et al.*, 2002) y las comúnmente usadas para el cultivo de embriones son: suero fetal bovino, albúmina y macromoléculas como la polivinilpirrolidona (Kim y Yoon, 2002). Se sabe que estas proteínas poseen capacidades osmóticas en el medio de cultivo (Bavister, 1995), funcionan como amortiguadores (Mehta y Kiessling, 1990), ayudan como mediadores de solutos entre el medio y el embrión (Mehta y Kiessling, 1990) y también son fuente de nutrientes al desdoblarse en aminoácidos (Pemble y Kaye, 1976). Sin embargo, a pesar de las acciones secundarias ya mencionadas, su función primordial en un cultivo embrionario es actuar como surfactante previniendo la adherencia del embrión al soporte (Blake *et al.*, 2002; Kim y Yoon, 2002). En el cultivo de embriones, la mayoría de las placas están hechas a base de poliestireno, el cual es susceptible a desarrollar cargas electrostáticas (Cassidy *et al.*, 1999). En un medio sin proteína, esas cargas atraerán a las proteínas de los embriones y la manipulación se dificultará para el embriólogo (Blake *et al.*, 2002). El adicionar proteína al medio de cultivo y cubrir los materiales como placas y pipeta con la misma, es una técnica usada de rutina en todos los laboratorios (Fernández y Hansen, 2010), y tiene la finalidad de bloquear las cargas y evitar que los embriones se fijen a las paredes de los materiales usados y entre ellos para así poder manipularlos de la forma deseada (Elder y Dlae, 2000). Si las proteínas empleadas para la manipulación de embriones permanecen en el cryotop en el cual van a ser vitrificados, como podría suceder con los soportes usados, puede ocasionar que el filamento de polipropileno pierda sus propiedades adherentes y que no permita que los embriones permanezcan en el filamento como es debido y se desprendan fácilmente durante el proceso de vitrificación, almacenaje o desvitrificación, ocasionando las pérdidas embrionarias observadas en este estudio. La contraparte del cryotop en este experimento, los OPS, eran nuevos, y debido a su morfología funcionan diferente que un sistema abierto con respecto a su adherencia, por lo tanto en el OPS, para evitar que se pegaran los embriones dentro del capilar y se perdieran fue necesario adicionarles proteína, por lo que se les recubrió con Suero Fetal Bovino. Así la proteína actuó en contra en un soporte (cryotop) y a favor en el otro (OPS), creando la diferencia en las pérdidas embrionarias. Debido a lo anterior, se cree que la principal causa de la pérdida de embriones relacionada al tipo de soporte tipo Cryotop en este estudio, es que todos los cryotop empleados eran reusados y que el lavado efectuado pudo

no ser suficiente para eliminar las proteínas presentes y los embriones no se pudieron adherir a ellos correctamente tras su vitrificación.

Otro punto clave para la obtención de altas tasas de viabilidad embrionaria tras la vitrificación, es la experiencia del embriólogo (Vajta y Kuwayama, 2006). De acuerdo a diferentes estudios, (Chian *et al.*, 2004; Tsang y Chow, 2009; Sripunya *et al.*, 2010) hay soportes que necesitan de mayor experiencia que otros y una de las mayores ventajas que presenta el OPS es precisamente su facilidad de manejo para cargar a los embriones en el soporte y para recuperarlos después del proceso de desvitrificación (Vajta *et al.*, 1998). Estudios en los que se compara el OPS contra otro sistema de soporte como cryoloop (Hurttt, *et al.*, 2000) y la micro gota (Báez-Contreras *et al.*, 2009), se muestra que se necesita más práctica cuando se utiliza soportes diferentes al OPS. En contraparte, cuando se utiliza el sistema cryotop, se menciona precisamente lo contrario, informando que la experiencia es un punto clave para lograr una exitosa vitrificación de embriones y con ella altas tasas de viabilidad (Kuwayma, 2005; Cobo *et al.*, 2008, Lazcano *et al.*, 2010). En el presente estudio era la primera vez que se experimentaba con ambos sistemas de vitrificación y la experiencia o facilidad de cada soporte para su manejo pudo haber jugado un punto clave en la recuperación de embriones post-vitrificación. Así, en este estudio, las pérdidas de aquellos embriones que se vitrificaron y después ya no pudieron ser recuperados al momento de su desvitrificación pueden deberse a factores tales como el estado propio de los soportes (nuevos vs. reusados), el sistema propio del soporte, la facilidad para manejar los dos tipos de soporte y la experiencia del operador. El cryotop, al ser un soporte reutilizado, con un sistema abierto y necesitar mayor práctica presentó mayores pérdidas embrionarias.

En resumen, en el presente ensayo se usaron dos tipos diferentes de soportes (OPS y cryotop), fabricados con distintos materiales (polipropileno vs. poliuretano) y que utilizaron diferentes cantidades de volumen de muestra (1 μ l vs 0.1 μ l). Como consecuencia, los embriones durante el proceso de vitrificación, fueron expuestos a diferentes velocidades de enfriamiento (25000°C/min vs. 42000°C/min), lo que pudo ocasionar una mayor muerte celular debido a la mayor formación de cristales cuando se utilizó el OPS. Éste estudio confirma que el daño infringido a un embrión vitrificado es dependiente de la velocidad de enfriamiento a la que es enfriado y que el tipo de soporte es determinante para establecer esa velocidad de enfriamiento.

VIII. CONCLUSIÓN

Este estudio muestra, que al utilizar tipo de soporte OPS el embrión sufre mayores daños celulares que cuando se usa el cryotop, los cuales se pueden ver reflejados en la cantidad de células positivas a TUNEL que presentan los embriones tras ser desvitrificados. El método cryotop, presenta demasiadas pérdidas embrionarias, por lo que si se escoge este soporte como método de vitrificación se debe de asegurar que los soportes sean nuevos y haber adquirido experiencia previamente.

IX. REFERENCIAS

- Abdalla H, Shimodaa M, Haraa H, Moritac H, Kuwayamac M, Hirabayashid M, Hochia S. Vitrification of ICSI- and IVF derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. *Theriogenology*. 2010; 74:1028-1035.
- Aghsa Y, Monson RL, Northey DL, Abas Mazni O, Schaefer DM, Rutledge JJ. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: Normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*. 1998; 50:147-162.
- Aguilar M, Galina C, Merchant H, Montiel F, Canseco R, Márquez TY, Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*. 2002; 37:1-6.
- Albarracín JL. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica de open pulled straw: estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo in vitro. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona 2005.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science. Fifth edition 2009.
- Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger III CE, Block J, Tatcher WW, Hansen PJ. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology*. 2002; 58:171-182.
- Baczkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reproduction Biology*. 2004; 4(1):5-22.
- Báez-Contreras F, Pirela-Pirela M, Landinez JA, Villamediana-Monrea P. Efecto de la vitirificación sobre la viabilidad de ovocitos bovinos madurados in vitro. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. Maracaibo, Venezuela. 2009; 43:197-210.
- Bagis H, Sagirkaya H, Mercan HO, Dinnyès A. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution. *Molecular Reproduction Development*. 2004; 67:186-92.
- Basrur PK y King WA. Genetics then and now: breeding the best and biotechnology. *Revue Scientifique et Technique*. 2005; 24: 31-49.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction*. 1995; 1(2): 91-148.
- Betteridge KJ. Farm Animal embryo technologies: Achievements and perspectives. *Theriogenology*; 2006; 65, 905-913.
- Blake D, Svalander P, Silversand C, Hamberger L. Protein Supplementation of Human IVF Culture Media. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2002; 19: 137-143.

Bonilla L, Block J, D-vila Félix LA, Hansen PJ. Slow Freezing of Bovine Embryos Department of Animal Sciences, University of Florida and Embrogen. University of Florida 2007. <http://www.animal.ufl.edu/hansen/Protocols/embryocellnumber.htm>.

Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Molecular Human Reproduction*. 2008; 14: 679-690.

Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal Reproduction Fertility*. 1999; 117(1): 97-105.

Capalbo A, Rienzi L, Buccheri M, Maggiulli R, Sapienza F, Romano S, Colamaria S, Lussig B, Giuliani M, Palagiano A, Filippo Ubaldi F. The worldwide frozen embryo reservoir: methodologies to achieve optimal results. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011; 1221:32-39.

Cassidy OE, Rowley RW, Fletcher, Davies SF, Briggs D. Surface modification and electrostatic charge of polystyrene particles. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999; 182:199-211.

Celestino M y Gatica R. In vitro viability of split rabbit embryos before and after vitrification. 9th World Rabbit Congress. Verona, Italy. 2008: 315-320.

Chang CH, Huang JC, Shen PC. Method for microdop vitrification of cells. United States Patent Application Publication. 2006.

Checura CM, Seidel GE Jr. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology* 2007; 67: 919-930.

Chemindustri. 2010. www.chemindustry.ru/

Chen SU, Lien YR, Cheng YY, et al. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction*. 2001; 16:2350-2356

Chian R, Kuwayama M, Tan L. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *Journal Reproduction Development*. 2004; 50: 685-696.

Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertility and Sterility*. 2005; 84: 36-42.

Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remoh J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility*. 2008; 89:157-1664.

Contreras DA, Galina CS, Avila JG, Aspron MP, Moreno-Mendoza NM. A system to evaluate the quality of frozen embryos through short-term culture. *Animal Reproduction*. 2008; 106:369-379.

Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira, da Silva, Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Human Reproduction*. 2004; 2: 300-305.

De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Vecchio D, Campanile G, Gasparrini B. Cryotop vitrification for in vitro produced bovine and buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos at different stages of development. 2007:747-750.

Demyda PS, De Luca LJ, Millan MM. Use of Bovine Follicular Fluid as Media Supplement on in vitro Bovine Oocyte Maturation. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*. 2011; 68(2): 309-315.

Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reproduction*. 2000; 15(10): 2190-2196.

Dhali A, Anchamparathy VM, Butler SP, Pearson RE, Mullarky IK, Gwazdauskas FC. Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in vitro cultured mouse embryos. *Theriogenology*. 2009; 71:1408-1416.

Elder K y Dale Brian. *In vitro Fertilization*. Third edition. Cambridge press. 2000. Pp 127-139.

Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reproduction*. 2000; 15(4): 905-910.

Engineering toolbox. 2012. [Engineeringtoolbox.com](http://www.Engineeringtoolbox.com)

Eroglu A, Elliott G, Wright DL, Toner M, Toth TL. Progressive elimination of microinjected trehalose during mouse embryonic development. *Reproduction Biomedicine*. 2005; 10:503-510.

Fahy GM, Lilley TH, Lindsell H, Douglas MS, Merymann HT. Cryoprotectant toxicity and Cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*. 1990; 27:247-268.

Farin P, Britt J, Shaw D, Sleining B. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology*. 1995; 44: 339-350.

Fear M y Hansen PJ. Developmental Changes in Expression of Genes Involved in Regulation of Apoptosis in the Bovine Preimplantation Embryo. *Biology of Reproduction*. 2011; 84: 43–51.

Fernández y Hansen. IVF protocol. Dept. of Animal Sciences, University of Florida and Embogen. University of Florida 2010. <http://www.animal.ufl.edu/hansen/IVF/default.htm>

Fong Siow L, Rades T, Hoong-Lim M. Characterizing the freezing behavior of liposomes as a tool to understand the cryopreservation procedures. *Cryobiology*. 2007; 55: 210–221.

Fuhrer F, Mayr B, Schellander K, Kalat M, Schleger W. Maturation competence and chromatin behaviour in growing and fully grown cattle oocytes. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 1989; 36: 285–91.

Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biology Reproduction*. 1990; 42(1): 114-119.

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Human Reproduction*. 2001; 16: 2166-2170.

Galli C y Lazzari G. Embryo technologies in dairy cattle. *The 26th European Holstein and red Holstein Conferences 2005*; 3: 1-20.

Galli C y Lazzari G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reproduction of Domestic Animals*: 2008; 43, 1-7.

Garcia JM, Avelino KB, Vantini R. Estado da Arte da Fertilizacão in vitro em Bovinos. *Biocologia da Reprodução em Bovinos 2003*; 1:223-230.

García-Amador MI, Chávez-Badiola A, Medina-Flores J, Montoya-Sarmiento JE, Quiroz-Torres E, Martínez-Armas R, Ruvalcaba-Castellón LA. Vitricación en cryotop: un método altamente eficaz para la criopreservación de ovocitos humanos. *Gaceta Mexicana de Oncología*: 2009; 8:78-83.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertility and Sterility*. 2001; 76: 1175-1180.

GenStat 14th edition. 2011. Vsn International Ltd.

Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI, Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biology of Reproduction*. 2003; 69:1193-1200.

Godínez B. Evaluación de la viabilidad de embriones F1 frescos y congelados utilizando el cultivo embrionario. Tesis de Maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 2009.

Hafez ESE y Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición, ed México McGraw-Hill Interamericana. México 2002.

Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology* 1999; 51:165.

Hardy K, Handsyde A, Winston R. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. 1998; 597: 597-604.

Hardy K. Apoptosis in human embryo. *Reviews of Reproduction*: 1999; 4 125-134.

Hollis JM, Lovas FJ, Jewell PR, Coudert LH. Interstellar Antifreeze: Ethylene Glycol. *The AstroPhysical Journal*. 2012; 571 (1): 59–62.

Hung WT y Chow KL. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*. 2009; 46:564-572.

Hurt AE, Squires EL, Seidel GE. Vitrification of equine and bovine oocytes in ethylene glycol, ficoll and sucrose using open pulled straws. *Theriogenology* 2000; 5 166-170

IETS org. Colorado, EUA: International Embryo transfer society. 2012. <http://www.iets.org>
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. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *Journal Reproduction Development*. 2011; 57(4): 437-43.

Kader AA, Choi A, Orif Y, Agarwal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009; 7:99.

Koester M, Mohammadi-Sangcheshmeh MA, Montag Rings F, Schimming T, Tesfaye D, Schellander K, Hoelke M. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for. Embryonic developmental potential. *Reproduction and fertility*. 2011; 10: 2-34.

Kong I, Lee S, Cho SG, Cho SK, Park CK. Comparison of open pulled straw (ops) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology* 2000; 53: 1817-1826.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproduction Biomedicine Online*. 2005; 11:608-14.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Vitrification of human embryos using the CryoTip method. *Reproduction Biomedicine Online*. 2005; 11:608-614.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 2007; 67: 73–80.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification of human oocytes. *Reproductive BioMedicine* 2005; 3: 300-308.

Lane M y Gardner DK. Vitrification of Mouse Oocytes Using a Nylon Loop. *Molecular Reproduction and Development* 2001; 58: 342-347.

Lane M, Forest KM, Lyons EA, Bavister BD. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology*. 1999; 51: 167.

Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Society of Reproduction Fertility* 2006; 1470-1626.

Lazcano J, Maldonado I, López P, Dabbah J, Moreno J, Bermúdez A, Gaytán JEM. Estudio clínico comparativo. Resultado de la vitrificación y desvitrificación de embriones humanos con dos tipos de sistemas abiertos: Cryotop vs Cryolock. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 2010; 2 (3): 79-83.

Leibo SP y Mapletoft RJ. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. 17th. Annual Convention of the American Embryo Transfer Association (AETA), October, San Antonio, Texas. 1998; 91-98.

Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro derived embryos. *Theriogenology*. 1993.

Leibo SP. Cryopreservation of oocytes. Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*. 2008; 1; 69(1): 37-47.

Liang Y y Parnpai R. Survival rates of matured buffalo oocytes after vitrification by microdrop and cryotop and subsequent embryo development after ICSI. *Proceedings of the 48th Kasetsart annual conference*. Kasetsart, Thailandia 2010; 48: 710-715.

Liebermann J. Vitrification of oocytes and embryos. *Current Frontiers in Cryobiology*. 2011:170-184.

Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? *Reproduction Biomedicine Online*. 2003; 7:623-33.

Loneragan O y Fair T. In Vitro produced bovine embryos- Dealing with the warts. *Theriogenology*: 2008; 69, 17-22.

Loneragan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction Development*. 1994; 37: 48-53.

Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, Levendah P, Raty M, Peippo J, Greve T, Callesen H. Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction*. 2005; 130: 66-67.

Lucy MC. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*: 2001; 84, 1277-1293.

Mahmoud KG, Scholkamy TH, Ahmed YF, Seidel GE Jr, Nawito MF. Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reproduction Domestic Animals*. 2010; 45(4): 565-571.

Makarevich AV y Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biology of Reproduction*. 2002; 66:386-392.

Mapletoft RJ y Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Science Technology*. 2005; 24 (1): 393-403.

Márquez AYC, Galina CS, Castilla B, León H, Moreno-Mendoza N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the TUNEL technique. *Reproduction Domestic Animals*. 2004; 39: 141-145.

Márquez AYC. Utilización de la técnica de transferencia de embriones para evaluar la estacionalidad reproductiva en ganado cebú. Tesis de Doctorado Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2003.

Márquez YC, Galina CS, Moreno N, Ruiz H, Ruiz A, Merchant H. Seasonal Effect on Zebu Embryo Quality as Determined by Their Degree of Apoptosis and Resistance to Cryopreservation. *Reproduction Domestic Animals*. 2005; 40: 553-558.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling. *Biology of Reproduction* 1996; 54: 1059-1069.

Matwee C, Betts DH, King WA. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*. 2000; 8(1): 57-68.

Mazur P, Seki S, Pinn IL, Kleinhans FW, Edashige K. Extra-and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology*. 1995; 51:455-460.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Animal Journal Physiology*. 1984 247: 125-142.

Mehta TS y Kiessling AA. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. *Biology of Reproduction*. 1990; 43: 600-606

Moore K y Quadros BA. Cryopreservation of mammalian embryos: the state of the art. *Animal Reproduction and Biological Sciences*: 2006; 8:19-32.

Moore K y Thatcher WW. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*: 2006; 89, 1254-1266.

Morató R, Izquierdo D, Paramino MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*. 2008; 57: 137-141.

Morató R, Izquierdo D, Albarracín JL, Anguita B, Palomo MJ, Jimenez-Macedo AR, Paramio MT, Mogas T. Effects of pre-treating in vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. *Molecular Reproduction and Development*. 2008; 75:191-201.

Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reprod Fertil Dev*. 2010; 22:1141-7

Moreira F, Paula-Lopes FF, Hernández-Cerón J, Moore K y Hansen PJ. Protocol to count cell number in preimplantation embryos using nuclear staining with Hoechst 33342 or DAPI. University of Florida 2001. [http:// www.animal.ufl.edu/hansen/Protocols/embryocellnumber.htm](http://www.animal.ufl.edu/hansen/Protocols/embryocellnumber.htm).

Moriwaki T, Suganuma N, Hayakawa M, Hibi H, Katsumata Y, Oguchi H, Furuhashi M. Embryo evaluation by analyzing blastomere nuclei. *Human Reproduction*. 2004; 19: 152-156.

Moussa M, Perreau C, Baril G, Duchamp G, Vidament M, Daels P, Bruyas J, Mermillod P. Comparison of cell proliferation index in equine and caprine embryos using a modified BrdU incorporation assay. *Theriogenology*. 2005; 64: 1823-1832.

Moussa M, Perreau C, Baril G, Duchamp G, Vidament M, Daels P, Bruyas JF, Mermillod P. Comparison of cell proliferation index in equine and caprine embryos using a modified BrdU incorporation assay. *Theriogenology* 2005; 64: 1823-1832.

Naitana S, Dattena M, Gallus M, Loi P, Branca A, Ledda S, Cappai P, Recipient synchronization affects viability of vitrified ovine blastocysts. *Theriogenology*. 1995; 43: 1371-1378.

Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer J, Seidel GE, Camevale E, Squires EL. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*. 2001; 55: 607-613.

Opiela J. Apoptosis in preimplantation bovine embryos and methods used for its detection. *Animal Science*. 2009; 9: 3- 16.

Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Susuki T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by Ethylen Glycol with Sucrose. *Cryobiology*. 1995; 32:455-460.

Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, Lonergan P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*. 2002; 74:35-44

Park SP, Young KE, Hoon OH J, Kyung NH, Sil Lee K, Young Park S, Mi Park E, Hyun YS, Chung KS, Ho Lim J. Ultra rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Human Reproduction*. 2000; 15: 1787-1790.

Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44: 859-869.

Paula-Lopes F y Hansen PJ. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 295:37-42

Paula-Lopes F, Jousan FD, Roth Z, Soto P y Hansen PJ. Tunel Procedure in Bovine Embryos. University of Florida 2001. [http:// www.animal.ufl.edu/hansen/Protocols/tunel.htm](http://www.animal.ufl.edu/hansen/Protocols/tunel.htm).

Paula-Lopes FF y Hansen PJ. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos Is a Developmentally Regulated Phenomenon. *Biology of Reproduction*. 2001; 66:1169-1177.

Pemble LB y Kaye PL. Whole protein uptake and metabolism by mouse blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1976; 78:149-157

Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*. 2008; 9 (4): 267-277.

Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. 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*. 2000; 28; 58(1-2): 9-22.

Roelen BAJ, Aguilar B, Tharasanit T, Colenbrander B, Kidson A, Teerds SJ, Rubio Pomar FJ. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*. 2005; 63:2254-2268.

Romero-Arredondo A y Seidel G.E. Jr. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine Oocytes. *Theriogenology*. 1994; 41: 383-394.

Rubio Pomar FJ, Ducro-Steverink DWB, Hazeleger W, Teerds KJ, Colenbrander B, Bevers MM. Development, DNA fragmentation and cell death in porcine embryos after 24 h storage under different conditions. *Theriogenology*. 2004; 61: 147–158.

Sa Barreto LS, Caido,VSD, Garcia JM, Mingoti GZ. Meiotic inhibition of bovine oocytes in medium supplemented with a serum replacer and hormones: effects on meiosis progression and developmental capacity. *Zygote*. 2011; 19: 107–116.

Saragusty J y Arav A. Current Progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction and Fertility*. 2011; 18: 141 1-19.

Sartori R, Bastos MR y Wiltbank MC. Factors affecting fertilization and early embryo quality in single and superovulated dairy cattle. *Reproduction Fertility and Development*. 2010; 22: 151-158.

Schilling E, Smidt D, Sacher B, Petac D, Kaschab EL. Diagnosis of the viability of early bovine embryos by fluorescence microscopy. *Animal Biology*. 1997; 19: 1625-1629.

Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reproduction*. 2000; 15: 2394-2403.

Seidel GE Jr. Sexing mammalian sperm –overview. *Theriogenology*. 2003; 52 (8): 1407-1420.

Seidel GE Jr. Cryopresrvation of equine embryos. *Reproductive Technology*. 1996; 12:13-14.

Seidel GE Jr. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science* 1981; 211: 351-358.

Seidel GE Jr. y Seidel MS. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO. Colorado, EUA, 1991; 77: <http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E00.htm#TOC>.

Seidel GE, Elsdon RP, Hasler JF. Embryo transfer in dairy Cattle. Segunda edición, ed Hoard's Dairyman. EUA 1997.

Siegfried R and Mayer B. Ethylene Glycol. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2002.

Siqueira L, Barretto S, Sgobbi Dias Caiado Castro V, Mansano Garcia J, Zoccal Mingoti G. Meiotic inhibition of bovine oocytes in medium supplemented with a serum replacer and hormones: effects on meiosis progression and developmental capacity. *Zygote*. 2010; 19: 107- 116.

Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 1999; 38:95-105

Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 2001; 56:287-297

Sripunya N, Somfa T, Inaba Y, Nagai T, Ima K, Parnpa R. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 2010; 56:112-125.

Stachecki JJ, Cohen J, Garrisi J, Munne S, Burgess C, Willadsen SM. Cryopreservation of unfertilized human oocytes. *Reproduction Biomedicine Online*. 2006; 13:222-227.

Stokes PJ, Hawkhead J, Fawthrop RK, Picton HM, Sharma V, Leese H, Houghton FD. Metabolism of human embryos following cryopreservation: Implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. *Human Reproduction*. 2007; 22:829-835

Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Crocomo LF, Magalhães LC, Junior AM, Machado R, da Cruz Landim-Alvarenga F. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*. 2012; 11:1-8.

Sun X, Li Z, Yi Y, Chen J, Leno GH, Engelhardt JF. Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. *Biology of Reproduction*. 2008; 79: 832-840.

Sutton-McDowall M, Robert B Gilchrist and Jeremy G Thompson. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocytes a developmental competence. *Reproduction*. 2010; 139:685-695.

Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Human Reproduction*. 2000; 15: 1396-1399.

Tsang WH y Chow KL. Cryopreservation of mammalian embryos: advancement of putting life on hold. *Birth Defects Research (part C)*. 2010; 90: 163-175.

Tsang WH y Chow KL. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity spatula. *Biotechniques*. 2009; 46 (7): 550-552

Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*. 2000; 60-61: 357-364.

Vajta G, Holm P, Kuwayama PJ, Booth H, Jacobsen T, Greeve T y Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. *Molecular Reproduction and Development* 1998; 51:53–58.

Vajta G, Home P, Greeve T, Callesen H. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology*. 1996; 45:683-689.

Vajta y Kuwayama M, Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006; 65:236 – 244.

Van Somm, Yuan Y, Peelman L.J, de Matos D.G, Dewulf J, Laevens A, de Kruif, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology*. 2002; 57: 1453-1465.

Van Soom AD, Wrathall AE, Herrler A, Nauwynck HJ. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? *Reproduction Fertility and Development*. 2010; 22: 21-31.

Van Wagtendonk-de Leeuw AM, den Daas JHG, Ra WF. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo. Methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*. 1997; 48:1071-1084.

Volkening C. Properties of Polypropylene Fiber Reinforced. *Materials Journal* 80: 610–614.

Walsh SW, Williams EJ y Evans ACO. A Review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*: 2011; 123, 127-138.

Weidenfeller B, Hofer M, Schilling FR. Thermal conductivity, thermal diffusivity, and specific heat capacity of particle filled polypropylene. *Applied science and manufacturing*. 2004; 35:423-429.

Whittingham DG. Survival of Mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*: 1977; 233; 125-126

Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004; 48: 146–156.

Yeomann RR, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann AA, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of rhesus monkey blastocysts. *Human Reproduction* 2001; 16: 1965-1969.

Zhou GB, Hou YP, Jin F, Yang QE, Yang ZQ, Quan GB, Tan HM, Zhu SE. Vitrification of mouse embryos at various stages by open-pulled straw (OPS) method. *Animal Biotechnology*. 2005; 16(2): 153-63.

Zhou X.L., Al A, Naib D.W., Sun P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology*. 2010; 61(1): 66-72.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Human Reproduction*. 2002; 17:1327-1333.