



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD DE OVEJAS
RECEPTORAS DE EMBRIONES CONGELADOS LENTAMENTE O
VITRIFICADOS.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

OSCAR CASTRO MENDOZA

Tutor: VICENTE OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA
UNAM, FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

Comité Tutorial: JAVIER HERNÁNDEZ IGNACIO
UNAM, FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FERNANDO BORDERAS TORDESILLAS
UAM, UNIDAD XOCHIMILCO



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.

Dedicatorias

A mis bisabuelos por la dicha de haberlos conocido.

General Francisco Mendoza, María Rodríguez, José Lorenzo Camacho y
Guadalupe Castro.

A mis abuelos, por su ejemplo.

Jorge Castro, María Cristina Camacho, Francisco Mendoza y Cecilia López.

A mis padres, por la vida.

Lenin y María Trinidad.

A mis hermanos, por los momentos juntos.

Lenin y Lourdes.

A mis hijas, por todo lo que representan.

Ninel, Paulina y Anette.

A mis maestros.

A mis amigos.

A ti.

Agradecimientos.

Al Jurado y Comité tutorial.

Al Departamento de Reproducción Animal.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica.

(PAPITT), por el financiamiento al Proyecto IT 201512.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Antecedentes histórico de las técnicas criopreservación de embriones... 9	
2.2. Factores de variación de los métodos de criopreservación.....13	
2.3. Características de la congelación lenta con glicerol.....18	
2.4 Características de la vitrificación en pajillas de 0.25 cc.....20	
2.5 Particularidades de la criopreservación y criosensibilidad.....23	
III. OBJETIVOS.....	31
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS	32
VI. RESULTADOS.....	39
VII. DISCUSIÓN.....	41
VIII. CONCLUSIONES.....	45
IX. LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	46
X. LITERATURA CITADA.....	47

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Número y grado de desarrollo de los embriones recuperados de las donadoras.....	39
Tabla 2. Porcentaje de Fertilidad y promedio (\pm error estándar) de prolificidad en las receptoras de embriones criopreservados por congelación lenta o vitrificación.....	40
Tabla 3. Porcentaje de Fertilidad y promedio (\pm error estándar) de prolificidad en las receptoras de embriones con calidad 1 o 2.....	40

RESUMEN

Las técnicas de transferencia embrionaria en las especies de producción animal, tienen importantes aplicaciones prácticas y científicas, resaltando especialmente en la reproducción asistida, el mejoramiento genético, la transferencia de tecnología y la creación de bancos de germoplasma. Dos de los métodos más utilizados para la conservación de embriones, la congelación lenta con glicerol y la vitrificación, permiten alcanzar porcentajes o índices adecuados de supervivencia de las células embrionarias evaluadas a la descongelación o revitalización. Sin embargo, en los ovinos domésticos (*Ovis aries*), existe poca información relativa a la fertilidad y prolificidad que puede alcanzarse en las receptoras de embriones congelados o vitrificados. Para tal efecto, embriones congelados lentamente o vitrificados, en estadio de mórula o blastocisto (7 días de edad) y calidades 1 ó 2, fueron transferidos por pares a ovejas receptoras. En las receptoras de embriones congelados lentamente, la fertilidad fue de 61.9% (13 gestantes de 21 transferidas), mientras que para las receptoras de embriones vitrificados la fertilidad fue de 65.22% (15 gestantes de 23 transferidas), sin que se encontraran diferencias significativas entre estos valores ($P=0.82$). La prolificidad en las receptoras de embriones congelados lentamente fue de 1.19 ± 0.21 , mientras que la prolificidad en las receptoras de embriones vitrificados fue de 1.30 ± 0.20 . Como en el caso de la fertilidad, no se encontraron diferencias en los valores de prolificidad entre ambos tratamientos ($P=0.7$). Al comparar la fertilidad y la prolificidad entre las ovejas receptoras de embriones de calidad 1 y los de calidad 2, no se encontraron diferencias para dichos parámetros entre ambos niveles de calidad. Los valores de fertilidad fueron 62.5 % para los embriones y 64.3 % respectivamente ($P=0.9$), mientras que la prolificidad fue de 1.25 en ambos grupos ($P=0.9$).

Palabras clave: vitrificación, congelación lenta, criopreservación, embriones ovinos.

ABSTRACT

Embryo Transfer Techniques in animal production, and specially in sheep (*Ovis aries*), have important practical and scientific applications, like assisted reproduction, genetic improvement, technology transfer and creation of germ plasma banks. Slow freezing with glycerol and Vitrification are two of the most used cryopreservation techniques. Both strategies show high embryo survival rates after unfreezing and revitalization, but these rates are inconsistent. Some of the factors that determinate the success of a cryopreservation technique have been identified, but it is still unknown how much of the failure percentage is attributed to the stress, mediating mechanisms, and participating signaling substances of each technique, and how much impact these factors have on fertility and prolificity. To compare these parameters between slow freezing and vitrification techniques, embryos at morulae stage (7 day old) cryopreserved by both techniques were transferred to recipient ewes that previously received hormonal treatment. Fertility in ewes receiving slowly frozen embryos (61.9 %; 13 pregnant out of 21 transferred) was not different ($P = 0.82$) from fertility in ewes receiving vitrified embryos (65.22 %; 15 pregnant out of 23 transferred). Average (\pm standard deviation) prolificity in ewes receiving slow frozen embryos was 1.19 ± 0.21 , while this parameter averaged 1.30 ± 0.20 in ewes receiving vitrified embryos. No differences were found between these values ($P = 0.7$). When fertility and prolificity were compared between ewes transferred with embryos of quality degree 1 or 2, no differences were found ($P = 0.9$ for both parameters). Fertility values were 62.5 % for quality 1 embryos and 64.3 % for quality 1 embryos, while prolificity value was 1.25 for both groups ($P=0.9$).

Keywords: vitrification, slow freezing, cryopreservation, sheep embryos.

I INTRODUCCIÓN

Desde el siglo pasado (década de 1950), la transferencia de embriones (TE) se ha convertido en una herramienta indispensable en el mejoramiento y comercio de la genética de los animales domésticos, principalmente los de producción, sin restar aplicaciones en especies de compañía y fauna silvestre, esto a nivel mundial (Dobrinsky, 1996). Se han logrado importantes avances en el conocimiento y aplicaciones de los procesos implicados en esta técnica, como la biología del desarrollo y criobiología embrionaria, endocrinología de la gestación, reconocimiento materno, entre otras líneas de investigación afines.

Entre las especies domésticas, especialmente en las de producción o consumo, en las que se ha realizado esta técnica exitosamente, los bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) han sobresalido en cuanto al volumen de procedimientos realizados, resultados exitosos y distribución mundial (Massip, 2001). En el período comprendido entre los años, 2000 y 2005, la IETS (International Embryo Transfer Society) reportó que en esas especies, la cantidad de embriones transferidos aumentó en un 15.5 %, porcentaje del cual la mitad corresponde a embriones criopreservados (Thibier, 2006). Esto se ha debido a que en respuesta a las necesidades de consumo de la población humana, las técnicas de reproducción asistida en los bovinos presentan el mayor grado de tecnificación entre las especies domésticas. Este desarrollo tecnológico ha hecho posible que se aprovechen las múltiples bondades de la técnica de transferencia embrionaria, entre las cuales destacan: la mejora genética de poblaciones animales locales, el intercambio comercial a nivel mundial, disminución de riesgos zoo sanitarios y de adaptación, la conservación y producción de líneas genéticas, estirpes de interés científico o especies en peligro de extinción y la rápida reproducción de razas, líneas o grupos genéticos mejorados de alto rendimiento, adaptables a las condiciones locales (Christensen, 1991, Seidel, 1991, Schiewe *et al.*, 1995; Guerin, 1997; Celestinos y Gatica 2002, McEvoy, 2003, Guignot *et al.*, 2006). En la especie ovina (*Ovis aries*) la transferencia de embriones se ha adoptado con mayor lentitud, debido al supuesto alto costo requerido en su implementación, la inconsistencia en la respuesta superovulatoria y el requisito de realizarla por la vía quirúrgica (laparoscopia), suponiendo un mayor riesgo para la donadora de embriones, regularmente animales de alto valor genético y

económico (Maurer, 1978; Buckrell *et al.*,1989; Christensen, 1991; Fahning y García 1992; Schiewe *et al.*, 1995; Ishwar y Memon 1996; Guerin, 1997; Cognie, 1999; Mazur, 2008). Situación que debe de cambiar, para incrementar los niveles de producción ovina en México y países en vías de desarrollo. Lo anteriormente expuesto influyó para que en el año 2000, se calculara un volumen de transferencias modesto, a nivel mundial, que fluctuó entre cinco mil y diez mil procedimientos realizados, pero que puede resultar halagador si se compara con la cifra obtenida para 2005, año en que la práctica aumentó en un 150%, acumulando 25000 embriones transferidos, de los cuales el 50% correspondió a embriones criopreservados (Thibier, 2006).

Parte fundamental en la TE y responsable del éxito que ha tenido es sin duda la criopreservación (Leibo *et al.*, 1996; Massip, 2001). La criopreservación de gametos, tejidos y embriones, tiene importantes aplicaciones en la reproducción asistida, producción de animales de alto rendimiento, transferencia tecnológica y en la construcción y conservación de bancos de genes (Seidel, 1991; Fahning y García 1992; Sakul *et al.*, 1993; Betteridge, 1995; Schiewe *et al.*, 1995; Leibo *et al.*, 1996; Naitana *et al.*, 2000; Dhali, *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 2008). La TE permite la disponibilidad de embriones conservados a largo plazo sin necesidad de producirlos al momento de su transferencia, optimizando así las ventajas propias de la técnica (Fahning y García 1992; Sakul *et al.*, 1993; Schiewe *et al.*, 1995; Celestinos y Gatica 2002). Dos técnicas de criopreservación han sobresalido, para emplear con éxito en los pequeños rumiantes de producción, éstas son la congelación lenta con glicerol (CL) y la vitrificación (VIT). La primera describe el método más conocido, en que el embrión es expuesto por el suficiente tiempo a bajas concentraciones de crioprotectores e inmediatamente, es sometido a uno de varios patrones de descenso paulatino de la temperatura, la CL, también puede ser definida, como una forma de crear un delicado balance entre varios factores que rodean al embrión y que pueden causar daño durante el proceso de congelación, incluyendo la formación de cristales de hielo, con daño a la zona pelucida, tóxico y osmótico (Vajta y Kuwayama 2006). La vitrificación en cambio, ha tomado importancia relevante en los últimos años, en varias especies animales, incluyendo a los primates humanos (*Homo sapiens*) dada la gran ventaja de provocar significativamente menores lesiones celulares debidas a la cristalización, y también

porque ha derivado en resultados satisfactorios en estructuras delicadas con las que otros métodos no habían sido exitosos (Maurer, 1978; Rall 1987; Fahning y García 1992; Agca *et al.*, 1994; Leibo *et al.*, 1996; Vajta *et al.*, 1998; Dattena *et al.*, 2000; Massip, 2001). La técnica de vitrificación o “ultracongelación” , consiste en deshidratar y enfriar rápidamente a las células, aprovechando las propiedades osmóticas que ejercen altas concentraciones de crioprotectores, y en el que se elimina totalmente la formación de cristales de hielo, lográndose un estado parecido al vidrio o vítreo (Széll y Windsor 1994; Kasai, 1996; Kasai, 1997; Vajta *et al.*,1996a, Martínez *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2002b; Cuello *et al.*, 2004a; Horvarth y Seidel 2006). Tomando en cuenta estas particularidades, el objetivo de ambas estrategias de criopreservación se cumple a través de la formación ordenada de pequeños cristales de hielo en el interior de las células, buscando el menor daño a las membranas y al citoesqueleto de las mismas (Kasai, 1996; Meryman, 2007); que ello se efectúe así depende, otra vez en ambos casos, de factores de variación que aún continúan bajo investigación (Pollard y Leibo 1993; Miyake *et al.*, 1993; Pollard y Leibo 1994; Papis *et al.*, 2000; Arav *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Balasubramanian y Rho 2006).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes históricos de las técnicas de criopreservación de embriones.

La criopreservación o crioconservación, es una técnica que permite el almacenamiento de gametos, células y tejidos, con el objetivo que sean viables después del descongelamiento. Los inicios de la crioconservación tienen su origen en el interés de los científicos, por imitar los modelos de la naturaleza como el de anguilas árticas, nemátodos del suelo o ranas nórdicas, entre otros organismos de climas gélidos, que parecían no verse afectadas ante las extremadamente bajas temperaturas presentes en sus ecosistemas. Esta resistencia se asoció con su capacidad de almacenar en sus fluidos y tejidos, sustancias como la trealosa, la prolina y el glicerol, efectivos crioprotectores conocidos actualmente (Holt ,1997).

Lázaro Spallanzani, Profesor de Historia Natural en la Universidad de Pavia, Italia, realizó los primeros ensayos de congelación en 1803, demostrando la supervivencia de espermatozoides tras su enfriamiento y entibiamiento (Holt ,1997).

El trabajo original sobre la congelación de gametos fue desarrollado por Rostand en 1946 utilizando anfibios. Ya como una aplicación práctica e iniciando una serie de investigaciones, Polge y colaboradores en 1949, lograron la supervivencia de espermatozoides tras su vitrificación y parcial deshidratación. Estos estudios se realizaron por primera vez en mamíferos en 1952, en que Polge y Row aplicaron la criopreservación a espermatozoides de toro (*Bos taurus*) con buenos resultados. A partir de los hallazgos ocurridos de la investigación de congelación de semen, se extendió el uso de la criopreservación a distintos tipos de células, tejidos y embriones, tratando de descifrar cuáles crioprotectores eran los más indicados, a qué concentraciones y porcentajes, durante cuánto tiempo de exposición y a qué velocidad de enfriamiento tendrían que usarse para no inhibir el desarrollo posterior una vez revertido el proceso (Mazur *et al.*, 1991). A mediados de la década de 1950, Lovelock y Polge propusieron al glicerol, como el crioprotector más noble dadas sus características coligativas como su bajo punto de congelación y su función protectora ante el “efecto solución” al disminuir la concentración de electrolitos en la fracción de fluido no congelado (Fahning y García 1992; Holt, 1997). Fueron motivo de estudio, los

mecanismos por los que este crioprotector causa toxicidad, encontrando que incrementa la viscosidad citoplasmática, se inserta en la membrana bilípídica celular, interactúa con la dinámica de los microfilamentos citoplasmáticos, participa en el balance bioenergético y desencadena la activación de proteasas y fosfolipasas que disparan procesos de muerte celular programada y el daño celular en general. Hay que considerar que el grado de daño citotóxico que ejerce el glicerol, y cualquier otro crioprotector, depende de diversos factores que incluyen la temperatura y tiempo de exposición, la velocidad de enfriamiento e incluso de la especie de origen de las células en función (Maurer ,1978; Dobrinsky, 1996; Schiewe *et al.*, 1991; Meryman, 2007; Mazur *et al.*, 2008).

Sucedió en 1972 cuando se reportó la primera congelación exitosa de un embrión mamífero, correspondiente al de ratón, realizado por Whittingham y colaboradores, y un año más tarde, Wilmut y Rowson obtuvieron el primer becerro nacido de la transferencia de un embrión congelado lentamente (Whittingham, 1978; Kanagawa, 1978; Maurer 1978; Rall, 1987; Massip, 2001; Celestinos y Gatica 2002). Willadsen y colaboradores, en 1974 congelaron lentamente embriones ovinos, de 5 a 8 días de edad usando dimetil sulfóxido (DMSO) y una curva estándar de enfriamiento (Willadsen *et al.*, 1974; Maurer, 1978) y, cuando trataban de desarrollar una técnica de criopreservación menos demandante, en 1977 descubrieron que el proceso podía ser interrumpido a temperaturas relativamente altas (-25 a -35°C) antes de sumergir los especímenes en nitrógeno líquido (NL) y que el rápido entibiamiento (36°C/min) lograba mejores porcentajes de supervivencia a la transferencia, fundando así las bases de las técnicas de criopreservación conocidas actualmente (Rall, 1987; Pollard y Leibo 1994; Massip, 2001; Mazur *et al.*, 2008). En ese tiempo, se había elegido a la ampolleta de cristal, que se utilizaba para criopreservar semen, como el contenedor de almacén de los embriones, pero entre los años de 1979 y 1985 fue sustituida por la pajilla plástica francesa de 0.25 cc, utilizada en la inseminación artificial de diferentes especies animales, permitiendo un almacenaje más práctico, y la posibilidad de desarrollar el método de transferencia directa o “one step” (un paso), en el cual el medio que contenía el embrión era separado del diluyente con sacarosa por burbujas de aire, para que al descongelarse y ser agitadas, ocurriera la dilución al interior de la pajilla (Massip *et al.*,

1979; Massip *et al.*, 1982; Schiewe *et al.*, 1991; Massip, 2001; Dattena *et al.*, 2004). Estas modificaciones se consolidaron cuando en 1984, Leibo, empleando etilenglicol como crioprotector notó la necesidad de depositar el embrión en el aparato reproductor de la hembra lo antes posible, y utilizando los conocimientos recién generados por Renard *et al.* (1983) sobre el uso de sacarosa en la remoción de crioprotectores, pulió la técnica prescindiendo de la evaluación morfológica del embrión, de ahí que se le denominara como una técnica “libre de microscopio” (Renard *et al.*, 1983; Leibo, 1984; Massip *et al.*, 1987; Schiewe *et al.*, 1991; Celestinos y Gatica 2002; Martínez *et al.*, 2002a; Cuello *et al.*, 2004a). Este paso fue de vital importancia para aumentar la adopción de TE a nivel mundial pues, solo se requerían para realizarla 30 segundos y un termo o contenedor con agua tibia (baño María simple) por lo que se reducían los costos asociados a la evaluación embrionaria y al descarte de embriones que no reúnen las características morfológicas adecuadas para asegurar su transferencia exitosa. En el caso de la especie ovina, se ha calculado que este método originó un incremento del 7-8% en la prolificidad, lo que favorece un cambio positivo en la relación costo/beneficio (Renard *et al.*, 1983; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1994; Dinnyés *et al.*, 1995; Nowshari y Brem 2000; Martínez *et al.*, 2002b; Seidel y Walker 2006; Guignot *et al.*, 2006). En aquellos años, también se realizaban importantes avances en la vitrificación, ya que Rall y Fahy, describieron por primera vez un método estándar de vitrificación de embriones mamíferos, usando como modelo al ratón (Fahning y García 1992; Kasai, 1996; Dobrinsky, 1996; Massip, 2001; Campos-Chillón *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Tiempo después, Massip y colaboradores realizaron la vitrificación de embriones bovinos usando una mezcla de glicerol y propanediol (Van Der Zwalmen, 1989; Fahning y García 1992). En 1990, se introdujo el concepto de cristalización o “seeding”, anglicismo empleado con frecuencia, necesario en la correcta congelación ya que favorece la uniforme formación de cristales de hielo dentro de la solución criopreservante y el embrión (Massip, 2001).

Desde el inicio de estos hallazgos y con la meta de hacer una técnica cada vez más precisa, simple y mecanizada, se diseñó un barril criogénico o aparato de congelación MacDonald, que usaba un termo criogénico en cuya angosta boca, se insertaba una gradilla de acero inoxidable para aproximadamente 10 o 15 pajillas de 0.25 cc, en ella

también iba incluido un termómetro de carátula conectado con una pajilla llena del crioprotector utilizado (sistema que en conjunto toma el nombre de termocople) para medir la temperatura del interior del barril, para que ayudados por las ranuras de la gradilla, ésta pudiera descender sobre el nivel de nitrógeno líquido (NL) para regular la velocidad de enfriamiento hasta alcanzar los -32°C y sumergirlos en NL. Otro modelo mecanizado es el aparato de Robertson, en el que se utiliza metanol o etanol al 95% en un vaso de Dewar, que sobre el nivel de NL, dentro del metanol y controlado por un termocople, expone a las pajillas de 0.5 o 0.25 cc que contienen al embrión y mediante un soporte universal, regula el descenso de temperatura al introducir más el vaso de Dewar en el NL. Por último, el diseño de congeladoras automáticas programables disminuyeron los costos de la congelación ya que tras un entrenamiento sencillo cualquier técnico con bases de embriología podría congelar uniformemente hasta 45 embriones por ronda en aproximadamente 70 minutos de principio a fin, con la limitante del costo de la congeladora (Maurer, 1978; Massip *et al.*, 1982).

Estos sucesos, originaron la necesidad de desarrollar la nomenclatura para facilitar la identificación, codificación e intercambio internacional de embriones de especies domésticas y silvestres regulado por la IETS (IETS, 2009; Romo *et al.*, 2008). En el año 1996, el científico húngaro, Gabor Vajta, diseñó un implemento especial denominado "open pulled straw" (OPS) que hacía más fácil el método de vitrificación al adelgazar una pajilla plástica de 0.25 cc, calentándola en una platina y estirándola en su parte central, para una vez que se enfriara fuera cortada por la parte más fina. El sistema OPS consiste en la exposición a la solución vitrificante en un solo paso, por un tiempo ultracorto, en un volumen muy pequeño (0.5-2 μl). El fundamento radica precisamente en que la pajilla OPS cuyo diámetro interno es sumamente reducido (0.7-0.8 mm) permite aspirar por capilaridad una microgota (10-15 μl) de la solución, en la que dentro de los anteriores 45 segundos ha sido depositado el embrión y la cual es de inmediato sumergida horizontalmente en NL. Esta técnica ha modificado considerablemente lo conocido sobre crioconservación, pues ha superado con un método sencillo, obstáculos como la criosensibilidad e incluso la posibilidad de conservar estructuras sometidas a procedimientos invasivos de manipulación (Vajta *et al.*, 1996b; Vajta *et al.*, 1997; Booth *et al.*, 1998; Massip, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Jung *et al.*, 2008). A partir de

estas investigaciones y resultados, en 2006, se diseñó una pajilla aún más delgada denominada OPS ultrafina (ultra mini straw) o SOPS (superfine open pulled straw), y otros investigadores utilizaron implementos como: gradillas de cobre para microscopio electrónico o placas metálicas (sistema cryoleaf) enfriadas con NL, pajillas adelgazadas y enroscadas denominadas crioloops, que permiten una fácil manipulación durante la vitrificación y desvitrificación. También fue creado el equipo Vit Master con un sistema de entrada de NL a presión negativa que reduce la temperatura hasta -210°C a partir de su temperatura normal de -196°C; o mallas de nylon, capilares de cristal adelgazados y abiertos, todos con pocas mejoras pero constantes al reducir más la velocidad de enfriamiento (Arav y Zeron 1997; Arav *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000; Hochi *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004b; Seidel y Walker 2006).

Actualmente la tendencia es la modificación de los embriones para hacerlos más susceptibles de ser congelados, como en el caso de la centrifugación o delipidación en los embriones porcinos, electro-fusión con liposomas para estabilizar los lípidos, tratamiento con citocalacina o colchicina para estabilizar el citoesqueleto, incubación con colesterol-metil- β -ciclodextrina para estabilizar el empaquetamiento membranal de lípidos, desnudamiento asistido con agentes químicos o con ayuda del micromanipulador o la extracción de líquido del blastocelo de embriones equinos o humanos de gran diámetro (Nagashima *et al.*, 1994; Leibo *et al.*, 1995; Dobrinsky, 1996; Beebe *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2000; Massip, 2001; Cuello *et al.*, 2004b; Duke *et al.*, 2004; Seidel 2006; Horvarth y Seidel 2006; Balasubramanian y Rho 2006; Mucci *et al.*, 2006; Kader *et al.*, 2007a; Kader *et al.*, 2007b; Scherzer *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Sin embargo, estas técnicas están lejos de ser aplicadas en la práctica rutinaria, pues su ejecución implica inversión de tiempo valioso y la ruptura de la zona pelúcida (ZP) limitando su comercio. Además, algunas de ellas han demostrado capacidad de desarrollo sólo en condiciones *in vitro* no pudiendo derivar en partos de crías nacidas vivas (Massip, 2001; Cuello *et al.*, 2004a).

2.2. Factores de variación de los métodos de criopreservación. Los métodos de criopreservación responden a necesidades particulares, pero en general siguen un mismo sistema de congelación: exposición a sustancias crioprotectoras, tipo de envase y envasamiento del espécimen de acuerdo a su naturaleza, disminución de la

temperatura a una velocidad determinada y la exposición directa al NL, para permanecer ahí por tiempo indefinido hasta su empleo. Existen factores clave a controlar que son fuente de variación como: tipo celular a criopreservar, cantidad de la muestra, crioprotector a elegir, su concentración, combinación con otras sustancias, su método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio; la velocidad de enfriamiento, necesidad de dilución del crioprotector para extraerlo de las células y velocidad de entibiamiento. Todas estas variables están relacionadas de algún modo con la permeabilidad y toxicidad de los crioprotectores y la regulación del criodañó (Schneider y Mazur 1984; Rall, 1987; Schiewe *et al.*,1991; Miyake *et al.*,1993; Dinnyés *et al.*,1994; Tervit *et al.*,1994; Kasai 1996; Arav *et al.*,2000; Papis *et al.*,2000; Kong *et al.*,2000; Massip, 2001;Tran *et al.*,2004; Meryman, 2007).

Tipo celular. Las células poseen límites osmóticos particulares, disposición de lípidos y otras partículas en la membrana celular y en general pueden tener diferente superficie de contacto, determinados por su tamaño y morfología, esto produce que puedan ser más o menos sensibles a la ruptura membranal irreversible, debida al cambio de fase ocurrido durante el proceso de enfriamiento o al aumento del tamaño celular por entrada de agua durante su revitalización (Holt, 1997; Meryman, 2007; Mazur *et al.*, 2008). Por ello, las células del embrión determinan la criosensibilidad, acorde a los cambios celulares que ocurren conforme transcurre su desarrollo (Balakier *et al.*, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Mazur *et al.*, 2008).

Crioprotectores. Los embriones son congelados adicionando en el medio sustancias denominadas crioprotectoras, que cambian el comportamiento físico de la solución y protegen a las células de los daños relacionados al descenso térmico. Las características de un buen crioprotector son una alta permeabilidad y baja toxicidad (Dattena *et al.*, 2004). Los agentes crioprotectores son solutos orgánicos que son utilizados para proteger a los organelos intracelulares durante el almacenamiento por periodos indefinidos de tiempo en nitrógeno líquido (Dobrinsky,1996). Los crioprotectores son sustancias o combinaciones de elementos que protegen la integridad de las membranas celulares durante el proceso de enfriamiento; en su presencia, las células suelen deshidratarse parcialmente previniendo la formación de grandes cristales de hielo y la degeneración proteica resultante de la exposición al frío.

Además, reducen el punto de congelación de los líquidos en que se encuentran al cambiar su composición electrolítica y osmótica, a la vez que aumentan la viscosidad interfiriendo con procesos de difusión, estabilidad lipídica de la membrana, permeabilidad al agua y el transporte de ATP, convirtiéndolas en sustancias tóxicas (Schiewe *et al.*, 1991; Dobrinsky, 1996; Celestinos y Gatica 2002; Dattena *et al.*, 2004; Mazur *et al.*, 2008). Pueden clasificarse como intra o extracelulares debido a su capacidad de entrar en la célula para ejercer sus funciones.

Entre los crioprotectores intracelulares, permeables o de bajo peso molecular se incluyen el DMSO (dimetil sulfóxido), el EG (etilenglicol), el PG (propilenglicol), el PEG (polietilenglicol), el 1-2 propanediol, el butanediol, el etanol, la acetamida, el glicerol y otros alcoholes (Miyake *et al.*, 1993; Dobrinsky, 1996; Celestinos y Gatica 2002; Meryman, 2007). Los crioprotectores extracelulares, impermeables o de alto peso molecular incluyen a azúcares como la fructuosa, lactosa, rafinosa, sacarosa, trealosa, sorbitol dextrano, galactosa; polímeros como polivinilpirrolidona (PVP) y el Ficoll, o compuestos anfipáticos como la glicina, la betaína, glutamina y prolina. Su modo de acción es extraer el agua no congelada del interior de la célula y cambiar el gradiente de concentración de sales en la solución acuosa, aumentando su viscosidad por lo que son muy útiles para preservar membranas a baja actividad de agua (Celestinos y Gatica 2002). Para aprovechar las ventajas de ambos tipos de crioprotectores y reducir su toxicidad, muchos autores han optado por combinarlos en la formulación de medios de congelación, descongelación y vitrificación (Kasai, 1996; Kaidi *et al.*, 2000; Meryman, 2007), procurando que exista la mayor cantidad posible de crioprotector unido al agua estructural y la menor cantidad del mismo, libre en el citoplasma para no producir detrimento en la viabilidad ni en la protección celular (Rall, 1987; Dattena *et al.*, 2004).

Para disminuir la toxicidad de los crioprotectores se han adoptado diversas técnicas. La adición de macromoléculas y azúcares resulta en la disminución de la toxicidad química de los crioprotectores (Kasai *et al.*, 1990). Estas sustancias pueden penetrar o no la membrana plasmática en las células embrionarias (crioprotectores penetrantes y no penetrantes respectivamente). Los agentes penetrantes como el glicerol, etilenglicol, dimetilsulfoxido y propilenglicol son los más empleados y su mecanismo de acción es el de reemplazar el agua intracelular previo al enfriamiento, lo cual en combinación con un

índice de descenso térmico lento y controlado, reducen los cambios de volumen celular y minimizan la cristalización intracelular, entre los principales agentes penetrantes, el etilenglicol, es el menos tóxico, seguido del glicerol (Cabodevila y Teruel, 2001). Los crioprotectores no penetrantes (azúcares tales como la sacarosa y la trealosa), ejercen su efecto de acción a través de un aumento extracelular en la osmolaridad de las soluciones de criopreservación, favoreciendo la deshidratación celular y reduciendo la formación y tamaño de los cristales de hielo (Mucci *et al.*,2007). La inclusión de sacarosa en la solución de congelamiento o vitrificación promueve la contracción y reduce la cantidad intracelular del crioprotector, lo cual ayuda a evitar que las células tengan cambios osmóticos drásticos, cuando son puestos en contacto con la solución de vitrificación (Lane M, Scoolcraft W, Gardner D, 1999).

Velocidad de enfriamiento. Asociada a variables como la cantidad de la muestra, el contenedor o envases a utilizar y la viscosidad de los medios de vitrificación, esta velocidad tiene influencia directa o determina el tamaño de los cristales de hielo. (Mazur *et al.*, 2008). De acuerdo a ella, existen 5 posibles velocidades de enfriamiento: congelación de velocidad controlada, congelación con polímeros no penetrantes, congelación ultrarrápida, vitrificación y congelación de equilibrio (Rall, 1987; Papis *et al.*, 2000; Meryman, 2007). Cuando se habla de vitrificación en distintos dispositivos, éstos suelen variar la velocidad de enfriamiento pues el diámetro interno aumenta la superficie de contacto del embrión con el nitrógeno líquido (NL), reduciendo el tiempo, volumen y la concentración de los crioprotectores a los que es expuesto el embrión. Así, la pajilla de 0.25 cc logra una velocidad de enfriamiento de 2'500°C/min, la OPS de 200'000°C/min y el dispositivo Vit Master de 800'000°C/min (Cuello *et al.*, 2004b).

Dilución secuencial. Es empleada con el objetivo de exponer o remover los crioprotectores de las células sin dañar el potencial osmótico de forma irreversible, a la vez que permite la salida de agua y rehidratación de las células para mejorar las propiedades a la criopreservación. Consiste en depositar por algunos minutos los embriones en distintos pozos, 3 a 6 generalmente, que contienen concentraciones escalonadamente mayores del crioprotector, a partir de una solución bufferada y fosfatada (PBS) o de mantenimiento, para que la sustancia ingrese controladamente a las células; en el caso opuesto, durante el retiro del crioprotector previo a la

transferencia, se inicia de la máxima concentración usada para reducir gradualmente hasta llegar a la solución PBS libre de crioprotectores. Su uso no es primordial, por lo que un protocolo puede prescindir de ella, sin embargo, se ha observado que la lenta dilución para retirar el glicerol mejora los resultados, sobre todo cuando se emplean pocos pasos de dilución, a pesar de correr el riesgo de que el volumen celular tenga un aumento o disminución (Maurer, 1978; Schneider y Mazur 1984; Schiewe *et al.*, 1991; Khurana y Niemann 2000).

Tiempo de exposición a crioprotectores. Se prefieren tiempos de exposición lo más cortos posibles. Sin embargo, este factor es determinado por la toxicidad y permeabilidad natural de los crioprotectores solos o combinados. De ahí que en el caso de crioprotectores altamente permeables y tóxicos como el etilenglicol (EG), los embriones sean expuestos en periodos muy cortos (3-15 minutos), requiriendo de métodos de transferencia directa, para posibilitar el cumplimiento de esta condición. Mientras que crioprotectores estables y de baja toxicidad como el glicerol pueden necesitar lapsos largos de exposición, de hasta 15 o 30 minutos, sin causar daño en la viabilidad de los embriones (Kasai, 1996; Martínez *et al.*, 2002b; Dattena *et al.*, 2004).

Temperatura de adición o extracción de crioprotectores. Se conoce que al atemperar o establecer, los medios de crioconservación a 20-24°C, la permeabilidad de los crioprotectores se favorece. Esto ocurre tanto al momento del equilibrio acelerando la entrada del crioprotector, como a la revitalización, en que permite la rápida salida de los crioprotectores a pesar de que aumenta el riesgo de crecimiento de cristales de hielo ya presentes en el embrión cuando la solución todavía se encuentra fría (Schneider y Mazur 1984; Kasai 1996; Campos-Chillón *et al.*, 2006; Meryman, 2007).

2.3. Características de la congelación lenta con glicerol. La congelación lenta (CL) o convencional, se define como la reducción constante de la temperatura usando velocidades de enfriamiento de alrededor de 0.5°/min y crioprotectores conocidos y disponibles comercialmente, sea manual o automáticamente, para lograr la uniforme formación de hielo en los espacios intra y extracelulares (Mazur *et al.*, 2008). Es una técnica de criopreservación en la que existe un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la velocidad de la formación de núcleos de hielo, esta diseñada para mantener un delicado balance entre el crioprotector a bajas concentraciones y los compartimientos acuosos del embrión (Guignot *et al.*, 2006). El objetivo fundamental de la CL, es controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que descienda la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula manteniendo el equilibrio osmótico y disminuyendo la posibilidad de causar daño al embrión por la formación de cristales de hielo intracelulares.

La congelación lenta con glicerol tiene ventajas relevantes como el aprovechamiento de la baja toxicidad de este crioprotector y la alta permeabilidad de los embriones a los glicoles, la uniformidad en los resultados obtenidos, la alta disponibilidad del equipo necesario, el gran número de embriones que pueden ser procesados por ciclo y la diversidad de especies animales en las que se ha aplicado con éxito (Pollard y Leibo 1994; Seidel y Walker 2006; Mucci *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Los porcentajes de fertilidad registrados en ovinos con esta técnica alcanzan un constante 60%, aunque el rango oscila entre 30 al 70% (Massip *et al.*, 1979; Renard *et al.*, 1983; Massip *et al.*, 1987; Sakul *et al.*, 1993; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1994; Caballero *et al.*, 1995; Dobrinsky, 1996; Agca *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2002a; Pryor *et al.*, 2006). Su mayor inconveniente es sin duda su alto costo, aún cuando no se invierta en un equipo de congelación programable, sumado a la imposibilidad de congelar estructuras con mayor criosensibilidad (Maurer, 1978; Vajta *et al.*, 1996a).

Se conoce que la congelación lenta de embriones provoca cambios como la pérdida de células del trofoblasto y de la masa celular interna (MCI), distorsiones morfológicas, degeneración de organelos, extrusión nuclear, alteraciones membranales y la deshidratación del citoesqueleto (Shea, 1981; Lehn-Jensen y Greve 1982; Kasai, 1996;

Valcárcel *et al.*, 1997; Kaidi *et al.*, 2000; Cocero *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Mucci *et al.*, 2006). Muchos de ellos son ocasionados por el proceso en sí aunque son parcialmente controlables, por ejemplo, aunque la cristalización o el anglicismo empleado con frecuencia “seeding”, controle el tamaño de los cristales de hielo al inducirse un estado de súper-enfriamiento, también origina daños asociados al calor latente resultante de la fricción de tales cristales durante el reordenamiento molecular y así, supone una fuerza opuesta al punto de congelación, por lo que para evitarlo se recomienda realizar la cristalización a temperaturas bajo cero en células lo suficientemente deshidratadas (Celestinos y Gatica 2002; Meryman, 2007).

En el método de congelación convencional lenta, de equilibrio o estándar, los embriones son expuestos a temperatura ambiente (20-22°C) al medio de congelación, compuesto por PBS y glicerol en un solo paso, durante un tiempo que puede ir de los 10 a los 30 minutos, incluyendo el tiempo que tome colocarlos en las pajillas plásticas y, son envasados en el centro de una columna del medio de congelación y separados hacia los lados por burbujas de aire y otras dos columnas del medio, ubicando al embrión en la columna media lo más centralmente posible (Celestinos y Gatica 2002). Esta disposición permitirá que el embrión no esté en contacto directo con las pinzas enfriadas en nitrógeno líquido al inducir la cristalización en las columnas adyacentes. La importancia de la cristalización o “seeding” es que forma o “siembra” pequeños cristales de hielo alrededor de núcleos o sitios de enucleación constituidos por componentes celulares como puentes de hidrógeno, minerales o proteínas estructurales, que conducirán a la congelación uniforme de las columnas de líquido en dirección al embrión (Maurer, 1978; Fahning y García 1992; Zeron *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Mucci *et al.*, 2006; Meryman, 2007). Después de este proceso, se puede iniciar el descenso controlado de la temperatura, ya que las moléculas que a temperatura fisiológica normal están en constante movimiento, empiezan a permanecer estáticas y una vez alcanzados los -40°C, el proceso de congelación sigue un patrón repetitivo en el cual las moléculas de agua forman núcleos o se agregan a ellos y los solutos empiezan a concentrarse (efecto solución), lo que conduce a un estado de deshidratación y al cambio de composición de la solución que resta por ser congelada y

por ende, también cambia su comportamiento criológico. A este fenómeno se le llama “búsqueda de la temperatura o del punto eutéctico” en que la disipación de calor encuentra un nuevo punto de equilibrio para congelar los componentes más parecidos a una fase líquida y por último todos los sólidos restantes. En resumen, la estrategia empleada por este modelo de criopreservación, es la velocidad de enfriamiento y la deshidratación causada por el efecto solución y la búsqueda del punto eutéctico, reduciendo los riesgos por cristalización, además de amortiguar la toxicidad química y el estrés osmótico (Massip *et al.*, 1987; Cuello *et al.*, 2004a; Campos-Chillón *et al.*, 2006).

2.4. Características de la vitrificación en pajillas de 0.25 cc.

Uno de los métodos de criopreservación más empleados en la actualidad es la vitrificación o “ultracongelación”, es el cambio de fase de una solución viscosa a un estado de gel al aplicar bajas temperaturas, formando un objeto semi-sólido amorfo conocido como estado “vítreo”, que mantiene la distribución iónica y molecular sin crear cristales de hielo (Rall, 1987; Fahning y García 1992; Széll y Windsor 1994; Kassai 1996; Dobrinsky, 1996; Holt, 1997; Martínez *et al.*,1998; Massip, 2001; Kuleshova y Lopata 2002; Celestinos y Gatica 2002; Martínez *et al.*,2002b; Horvarth y Seidel 2006; Meryman, 2007; Mazur *et al.*,2008).

La vitrificación tiene múltiples ventajas, entre ellas, la disponibilidad de un proceso relativamente simple, económico, adaptable a condiciones de campo y que no implica la adquisición de equipo especial. Además, el vitrificar un lote de embriones puede tomar de 7 a 10 minutos, pudiendo aplicarse a estructuras criosensibles con las que la congelación lenta no ha originado resultados favorables, como sería el caso de embriones manipulados de manera invasiva o con la zona pelúcida fracturada, o a tejidos y órganos completos para su posterior trasplante, y por último, se pueden formular medios de vitrificación sin derivados de origen animal (Miyake *et al.*,1993; Széll y Windsor 1994; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*,1994; Vajta *et al.*,1996a; Vajta *et al.*,1996b; Saha *et al.*,1996; Kasai, 1996; Booth *et al.*,1998; Peura *et al.*,1999; Semple *et al.*,1995; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*,2004a; Seidel y Walker 2006; Smith *et al.*,2006; Wang *et al.*,2007; Zhang *et al.*,2007).

La vitrificación produce índices de fertilidad variables de acuerdo a la metodología de vitrificación. En el caso de la especie ovina, la vitrificación OPS ha resultado en porcentajes de fertilidad del 20 al 70 e índices de desarrollo en cultivo del 50 al 95% (Papadopoulos *et al.*,2002; Dattena *et al.*,2004; Guignot *et al.*,2006), mientras que utilizando pajillas plásticas de 0.25 cc se pueden encontrar porcentajes de fertilidad entre el 13 y 70 y de desarrollo en cultivo de 57 y 100% (Schiewe *et al.*,1991; Traldi *et al.*,1999; Dattena *et al.*,2000; Massip, 2001; Dattena *et al.*,2004; Guignot *et al.*,2006). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se condujeron bajo distintas condiciones, usando protocolos de vitrificación diferentes, lo que hace difícil su comparación (Rall, 1987; Papis *et al.*,2000; Celestinos y Gatica 2002).

Por otro lado, las desventajas de la técnica por vitrificación incluyen la posibilidad de que las pajillas se quiebren, el riesgo tóxico de las altas concentraciones de crioprotectores, la precisión en el control del tiempo durante el proceso, la baja disponibilidad de medios de vitrificación comerciales y de contenedores especiales cuando no se usan pajillas de 0.25 cc, la limitada cantidad de embriones que se pueden procesar por ciclo, la necesidad de mantener el termo criogénico a los niveles máximos de NL para conservar el estado vitreo de los embriones y la gran diversidad de protocolos disponibles a elegir (Van Der Zwalmen *et al.*, 1989; Vajta *et al.*, 1996a; Seidel y Walker 2006; Palasz y Mapletoft 2006; Mazur *et al.*, 2008).

Los cambios celulares provocados por la vitrificación incluyen la pérdida de conexiones celulares, pérdida de microvellosidades, fractura de la membrana plasmática y de la zona pelúcida, incremento del volumen del retículo endoplásmico y la disminución del mismo a nivel mitocondrial (Van Der Zwalmen *et al.*, 1989; Holt, 1997; Kaidi *et al.*, 2000; Dhali *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Mucci *et al.*, 2006). Dichas complicaciones se deben principalmente a los cambios osmóticos drásticos ocupados dentro de su proceso, ya que durante la exposición a los crioprotectores hay deshidratación mientras que en la revitalización existe rehidratación poco controladas, además de la formación de cristales de hielo de entre 150 nm y hasta 0.3 micrones durante el entibiamiento, originándose así daños físicos y metabólicos (Kasai, 1996; Valcárcel *et al.*, 1997; Cuello *et al.*, 2004b; Meryman, 2007). En caso de que los daños sean muy extensos, el embrión puede ser afectado de manera

irreversible por las respuestas químicas y osmóticas montadas para contrarrestar esa fuente de estrés (Schneider y Mazur 1984; Kaidi *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002).

Para lograr con éxito la vitrificación en pajillas de 0.25 cc, es preciso utilizar una solución vitrificante compuesta de una alta concentración de crioprotectores que eviten la formación de cristales de hielo y que a la revitalización permita que sean removidos con rapidez del interior y del medio circundante al embrión, ya que resultan sumamente tóxicos (Massip, 2001; Cuello *et al.*, 2004a; Guignot *et al.*, 2006). Debido a ello, usualmente se recurre a una macromolécula no embriotóxica, de uso extracelular conocida como sacarosa, que ayuda a extraer los crioprotectores y cuyo uso en los medios de descongelación y entibiamiento es extendido, pues amortigua cambios repentinos en la osmolaridad que podrían atraer daño osmótico a los embriones por la entrada excesiva de agua (Cuello *et al.*, 2004a; Meryman, 2007). Por su parte, muchos investigadores han elegido al etilenglicol para la formulación de la solución vitrificante, ya que se requiere un agente permeable, capaz de ejercer más rápidamente sus efectos al difundirse entre las células más fácilmente, que además una menor reducción del tamaño del embrión y que a la revitalización pueden recuperar su estado osmótico con mayor rapidez. Ello conlleva al empleo de menores tiempos de exposición, lo que a su vez disminuye sus efectos tóxicos, sobre todo si es acompañado por sacarosa, polivinilpirrolidona o ficoll, pudiendo estos últimos sustituir además a la albúmina sérica bovina o al suero fetal bovino, para evitar los riesgos de transmisión de infecciones a través de ellos (Rall, 1987; Massip *et al.*, 1987; Seidel *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1994; Kasai, 1996; Saha *et al.*, 1996; Guerin, 1997; Massip, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Meryman, 2007). La mezcla completa de un agente permeable como el etilenglicol, una macromolécula (ficoll y un disacárido (sacarosa) constituye lo que se conoce como solución vitrificante, cuya baja toxicidad y volumen resulta muy eficiente (Rall, 1987; Kasai, 1996; Guignot *et al.*, 2006).

La inmersión directa en nitrógeno líquido es un paso vital en la vitrificación pues este dramático cambio de temperatura detiene el movimiento molecular y evita el ordenamiento de las moléculas de agua de acuerdo a sus cargas, con lo que no se provoca un cambio de fase propiamente dicho, no existe formación de cristales de hielo y no se genera calor latente (Arav *et al.*, 2000; Massip, 2001; Meryman, 2007). Por ello,

se debe vigilar que este cambio de temperatura tan repentino no rompa las pajillas plásticas, que no son tan flexibles como las células, por lo que las pajillas se mantienen una vez que han sido cargadas con el embrión, en cercanía de vapores de nitrógeno (entre -70 y -150°C) (Rall, 1987; Massip *et al.*, 1987; Massip, 2001; Pryor *et al.*, 2006; Seidel y Walker 2006). Por último, el término “entibiamiento” como una forma de revitalización no debe usarse indiscriminadamente como sinónimo de los términos “descongelación” y/o “desvitrificación”, de hecho constituye un término exclusivo de la revitalización de aquellos embriones que fueron vitrificados por cualquier método establecido. El término “descongelación” entonces se restringe a la revitalización de aquellos embriones que fueron congelados, mientras que el término “desvitrificación” describe la pérdida involuntaria del estado vítreo pasando al de la cristalización no controlada, hecho indeseable e incompatible con la viabilidad celular y embrionaria. Este último evento puede ocurrir cuando la porción vitrificada deja de estar inmersa en nitrógeno líquido, lo que provoca fluctuaciones de temperatura que le hacen perder el estado sólido (Rall, 1987).

Al entibiamiento, la presencia de sacarosa cumple con funciones distintas a las cumplidas durante el equilibrio, ya que acelera la velocidad de entrada de agua por encima de la velocidad de salida por difusión pasiva de los crioprotectores, pero sin ser lo suficientemente rápida como para hacer estallar las células o romper las membranas celulares, preparando al embrión para que al ser colocado en un medio isotónico como el medio de mantenimiento o el interior del útero, recupere su volumen normal. Además, cuando se utiliza el método de transferencia directa, estas macromoléculas son absorbidas rápidamente por el endometrio uterino, mientras que los crioprotectores aún remanentes en el embrión se diluyen con las secreciones presentes en el lumen uterino en donde es depositado (Rall, 1987; Fahning y García 1992; Dattena *et al.*, 2004; Cuello *et al.*, 2004a; Guignot *et al.*, 2006; Campos-Chillón *et al.*, 2006).

2.5 Particularidades de la criopreservación y la criosensibilidad

La criología incluye a todos los procesos que buscan la conservación de células, tejidos y embriones, a temperaturas bajo cero, generalmente a temperatura de nitrógeno líquido -196° C. Hay que considerar que toda célula sometida a un proceso de

criopreservación es susceptible de sufrir algún grado de daño. El daño criogénico o criodaño es la combinación del daño celular producido por la formación de hielo intracelular y los efectos metabólicos irreversibles resultantes de la exposición de células vivas a frío extremo (temperaturas cercanas a 0°C en un rango de +10 a -5°C) aún en ausencia de hielo (Pollard y Leibo 1994; Horvarth y Seidel 2006; Balasubramanian y Rho 2006; Mazur *et al.*, 2008). Se ha demostrado que tanto la congelación lenta como la vitrificación reducen el diámetro de los poros de la zona pelúcida de manera irreversible, endureciéndola y afectando la viabilidad, desarrollo y susceptibilidad del embrión posteriormente (Mazur *et al.*, 2008). Varios investigadores, coinciden en que el mayor impacto del criodaño ocurre en la estructura de sostén de la célula, su membrana y organelos entre los -15 y los -16°C, y aún evitando los daños producidos por la cristalización, todavía estarían latentes los riesgos asociados a los efectos del estrés osmótico o de la simple exposición a los crioprotectores (Rall, 1987; Mazur *et al.*, 1991; Pollard y Leibo 1994; Windsor y White 1995; Kasai, 1996; Dobrinsky, 1996; Holt, 1997; Beebe *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; Vallejo *et al.*, 2003; Mucci *et al.*, 2006; Campos-Chillón *et al.*, 2006).

Investigaciones diferenciales entre estructuras intactas, criopreservadas y expuestas a crioprotectores, confirman que estos últimos por si mismos, no son los responsables de la pérdida de la viabilidad celular, aunque sí existe una correlación con los cambios morfológicos, entre los que sobresalen la alta presencia de vesículas, el aumento del volumen mitocondrial, la degeneración nuclear, cambios en microtúbulos y la formación anormal de huso mitótico, defectos que se acentúan a temperaturas bajo cero o a la descongelación. Se ha reportado que el uso de glicerol puede inhibir el sistema Na-K-ATPasa de cuyo correcto funcionamiento depende el mantenimiento del gradiente osmótico celular (Sell, 1978; Schneider y Mazur 1984; Schiewe *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1994; Kaidi *et al.*, 2000; Arav *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2001; Albarracín *et al.*, 2005; Mazur y Koshimoto 2005; Park *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Por su parte, el estrés osmótico puede afectar el estado funcional de los canales de iones, modificando las concentraciones de elementos que fungen como señalizadores, como en el caso del calcio, de cuya concentración adecuada dependen procesos como la despolimerización

de los filamentos de actina (Kanagawa, 1978; Maurer, 1978; Széll y Windsor 1994; Kasai, 1996; Meryman, 2007).

La etapa de desarrollo determina la toxicidad y permeabilidad a los criopreservadores, estas características aparecen a partir de la fecundación y continúan incrementándose a medida que avanza el desarrollo embrionario, esto se debe a la creciente proporción entre el área y el volumen, ya que con el aumento en el número de los blastómeros éstas son cada vez más pequeños, sin embargo, la superficie que sus membranas celulares comprenden es cada vez mayor (Celestinos y Gatica 2002; Mazur *et al.*, 2008). Es aceptado que en los embriones de los rumiantes, el estadio óptimo para sobrellevar el procedimiento de la congelación lenta es el de mórula compacta a blastocisto (Shea, 1981; Massip *et al.*, 1982; Massip *et al.*, 1987; Miyake *et al.*, 1993; Cocero *et al.*, 2000; Massip, 2001; Martínez *et al.*, 2002b; Balasubramanian y Rho 2006; Seidel y Walker 2006; Scherzer *et al.*, 2006), mientras que utilizar blastocistos expandidos suele ser detrimental, debido a la cristalización incontrolada del líquido del blastocelo, que daña la adelgazada zona pelúcida y el trofoblasto embrionario, fracturando el embrión y afectando su recuperación osmótica. También se cree que este fluido obstaculiza la entrada de los crioprotectores permeables y que el menor tamaño de los blastómeros, en estadios avanzados, afectan la proporción entre área y volumen y con ello, la velocidad de penetración del crioprotector y el tiempo de exposición al mismo (Schneider y Mazur 1984; Sakul *et al.*, 1993; Duke *et al.*, 2004; Kader *et al.*, 2007b). Hay estudios que señalan que la criopreservación de embriones en estadios muy tempranos, origina bajos porcentajes o índices de fertilidad debido a la criosensibilidad provocada por el mayor cúmulo de lípidos en sus células y por tener una menor permeabilidad al glicerol (Maurer, 1978; Schneider y Mazur 1984; Fahning y García 1992; Miyake *et al.*, 1993; Széll y Windsor, 1994; Cocero *et al.*, 2000; Massip 2001; Cuello *et al.*, 2004b; Mazur *et al.*, 2008). Para el caso de la vitrificación con el sistema open pulled straw (OPS) el estadio de opción es el de blastocisto ($\leq 400 \mu\text{m}$), ya que es más tolerante al criodaño por sus menores reservas lipídicas y porque resisten mejor los repentinos cambios osmóticos (Kaidi *et al.*, 2000; Cuello *et al.*, 2004a; Campos-Chillón *et al.*, 2006); pero cuando se utilizan pajillas de 0.25 cc, etilenglicol y/o sacarosa en el medio vitrificante, es más favorable usar embriones en estadios más

tempranos como mórula tardía y blastocisto inicial (Massip *et al.*, 1989; Horlacher y Brem, 1994; Kasai, 1996; Celestinos y Gatica, 2002; Seidel y Walker, 2006; Scherzer *et al.*, 2006).

A pesar de esto, no todos los embriones pueden ser criopreservados, lo que puede deberse a sus diferencias de sensibilidad al frío relacionadas con la especie, la raza e incluso individuos, en que también tienen efecto el estadio de desarrollo y las condiciones en que el embrión fue originado (Schiewe *et al.*, 1991; Fahning y García 1992; Pollard y Leibo, 1993; Pollard y Leibo 1994; Leibo *et al.*, 1996; Balasubramanian y Rho 2006). Se ha identificado un diferencial en la viabilidad tras la revitalización establecido entre los embriones bovinos, ovinos, de ratón y de conejo, que resultan muy estables al congelarse, contra los derivados de porcinos o equinos, que no logran ser congelados con éxito en la mayoría de los casos (Polge *et al.*, 1974; Fahning y García 1992; Leibo *et al.*, 1996; Massip, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004a; Mazur *et al.*, 2008). Este fenómeno es conocido como criosensibilidad y se ha reportado en estructuras como los ovocitos de ratón y humano, en los espermatozoides porcinos, caprinos, caninos y de aves, así como en los embriones equinos, porcinos, y bovinos de razas derivadas del *Bos indicus*, como la Brahman o de aquellos embriones producidos *in vitro* (Chen *et al.*, 1994; Kasai, 1996; Holt, 1997; Lewis *et al.*, 1999; Khurana y Niemann 2000; Dattena *et al.*, 2000; Massip, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Campos-Chillón *et al.*, 2006). Hasta ahora no se conoce mucho de las razones de la aparición del fenómeno, pero se sabe que en el caso de aquellos embriones producidos *in vitro*, es debida a cambios estructurales sustanciales como la menor cantidad promedio de MCI, el mayor depósito de gotas de lípidos estructurales, así como por anomalías en las conexiones intercelulares, o a la alta presencia de vacuolas y enzimas que aumentan la susceptibilidad de la zona pelúcida a ser digerida y adelgazada a tal punto que hace al embrión más permeable, sensible al enfriamiento y propenso a infecciones (Massip *et al.*, 1982; Fahning y García 1992; Pollard y Leibo 1993; Leibo *et al.*, 1995; Vajta *et al.*, 1996a; Kaidi *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000; Abd El Razek *et al.*, 2000; Massip, 2001; Celestinos y Gatica 2002; Papadopoulos *et al.*, 2002; Jurisicova *et al.*, 2005; Dattena *et al.*, 2004; Balasubramanian y Rho 2006; Mucci *et al.*, 2006). Una de las variables más estudiadas en el fenómeno de criosensibilidad en los embriones producidos *in vitro* son

las anomalías en la distribución de lípidos, de cuyo arreglo desde la membrana celular hasta los plasmalógenos, depende el exitoso cambio de fase de fluido a gel ocurrido aún a temperaturas fisiológicas (temperatura de transición de fase) y que es modulado principalmente por los fosfolípidos que contienen ácido docosahexaenoico. De existir cambios irreversibles en el empaquetamiento lipídico durante el cambio de fase, las células pueden sufrir fragmentación, disfunción enzimática de ATPasas y anomalías en la homeostasis iónica a temperaturas menores a 17°C (Holt, 1997; Valcárcel *et al.*, 1997; Khurana y Niemann 2000; Holt, 2000; Zeron *et al.*, 2000; Horvarth y Seidel 2006). Se ha determinado que en los embriones bovinos producidos *in vitro*, los cambios lipídicos incluyen la mayor proporción de triglicéridos, menor concentración de fosfatidilcolina, de estéres del colesterol y de fosfatidiletanolamina, así como la inversión en la proporción de lípidos y proteínas (Abd El Razek *et al.*, 2000). Algunos estudios han demostrado que otro factor que hace menos criotolerantes a los embriones producidos *in vitro* es el período de cultivo post-fertilización. Así, los embriones cultivados bajo condiciones de laboratorio, son criológicamente más débiles que aquellos cultivados *in vivo* en el aparato reproductor de una hembra. También hay evidencia de que al mejorar las condiciones de cultivo utilizando co-cultivos con células epiteliales oviductuales o enriqueciéndolo con fluido oviductual sintético, ácido linoléico y/o albúmina, los embriones *in vitro* producidos (IVP) no son tan susceptibles al criodaño. Sin embargo, estas medidas correctivas no pueden revertir condiciones perjudiciales del cultivo *in vitro*, como la presencia de mayores concentraciones de oxígeno (>20%), la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) que al igual que la exposición a la luz artificial, las anormales concentraciones de calcio en los medios de cultivo y la presencia de suero propician daños en el genoma del embrión (Van Soom y Boerjan, 2002; Voelkel y Hu 1992; Leibo y Loskutoff 1993; Gandolfi, 1994; Semple *et al.*, 1995; Vajta *et al.*, 1996b; Martínez *et al.*, 1998; Viuff *et al.*, 1999; Vajta *et al.*, 1999; Berdugo y Bueno 2000; Viuff *et al.*, 2000; Khurana y Niemann 2000; Takahashi *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2000; Betts y King 2001; Massip, 2001; Rizos *et al.*, 2001; Papadopoulos *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2002a; Martínez *et al.*, 2002b; Vallejo *et al.*, 2003; McEvoy 2003; Rizos *et al.*, 2003; Dattena *et al.*, 2004). Cabe señalar que estos embriones suelen tener diferencias en la expresión de genes

(Khurana y Niemann 2000; Papadopoulos *et al.*, 2002), como lo confirman estudios alométricos y organométricos que reportan el desarrollo alterado de los órganos, presencia del síndrome de crías gigantes, senescencia orgánica acelerada como en el caso de la oveja clonada “Dolly”, o muerte neonatal debida a fallas en la placentación, derivadas de aplasia alantoidea, de metilación anormal en embriones derivados de transferencia nuclear o de una red vascular mal conformada (McCracken *et al.*, 2000; Berdugo y Bueno 2000; Martínez *et al.*, 2002a; McEvoy, 2003; Mucci *et al.*, 2006).

En el caso de los embriones ovinos se sabe que de manera general son menos criosensibles, pues aún aquellos embriones de distintos estadios de desarrollo o los producidos *in vitro*, parecen tener mayor resistencia al daño criológico que aquéllos de la especie bovina mantenidos bajo condiciones idénticas, por lo que se dice que el embrión ovino tiene mayor calidad intrínseca. Esta característica es aún más favorable para otros pequeños ruminantes como los caprinos (Polge *et al.*, 1974; Maurer, 1978; Fahning y García 1992; Massip, 2001; Papadopoulos *et al.*, 2002).

Se considera de excelente y buena calidad a los embriones que contengan blastómeros de tamaño uniforme con citoplasma claro no granulado, que el espacio perivitelino sea transparente y esté ocupado en menos del 10% por detritus de fragmentos celulares, que su desarrollo sea acorde al estadio o edad en la que fue aislado, con la zona pelúcida íntegra y del grosor adecuado al estadio de desarrollo, con pocas células que muestren signos de muerte tales como picnosis o células aisladas muy grandes (Shea, 1981; Van Soom y Boerjan 2002; Martínez *et al.*, 2002b; Makarevich *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). Al menos seis características parecen tener fuerte correlación con el potencial de desarrollo embrionario, a pesar de que no todas son apreciables bajo microscopía convencional, y éstas son, la apariencia del citoplasma, del pronúcleo y del nucleólo, el déficit citoplasmático, el grosor de la zona pelúcida y la velocidad mitótica (Sjöblom *et al.*, 2006). Algunos evaluadores sostienen que cualquier embrión que no tenga alguna de las características antes mencionadas es de pobre calidad (Martínez *et al.*, 2002b). Otros investigadores establecen calificaciones numéricas correspondientes a varias características de los embriones. Para la calidad embrionaria generalmente el 1 corresponde a las consideradas como excelente y buena, el 2 para la regular, 3 para la pobre y 4 para los degenerados y los

muertos. Para la apariencia de la MCI, el 1 significa grande y compacta, el 2 para claramente visible y el 3 para no discernible. Para el estadio de desarrollo el 1 corresponde a un ovocito no fertilizado, 2=embrión muerto degenerado con número de células no acorde a su edad (2-12 células en el caso de embriones de ovino colectados el día 6½ desde el estro), 3=mórula inicial, 4=mórula compacta, 5=blastocisto inicial, 6=blastocisto, 7=blastocisto expandido, 8=blastocisto en eclosión y 9=blastocisto eclosionado (desnudo) y expandido (Campos-Chillón *et al.*, 2006; Romo *et al.*, 2006; IETS 2009). La descripción de los estadios de desarrollo en el embrión ovino esperados a partir del día 6½ es: la mórula inicial tiene blastómeros que ocupan el 80% del espacio perivitelino, que son claramente visibles, esféricos y que se pueden contar, la ZP es gruesa, sin detritus, textura citoplásmica regular a ligeramente granular, sin parches oscuros ni vacuolas, espacio perivitelino ocupado por blastómeros y fragmentación en un 10-30%. Para la mórula compacta los blastómeros ocupan entre el 60-70% del espacio perivitelino, son poligonales y aunque todavía puede observarse los límites entre unos y otros, no es posible contarlos, también cuentan con una ZP gruesa e intacta, con citoplasma claro a ligeramente granulado y con menos de 10% de las células en fragmentación. En el blastocisto inicial se observa una o varias lagunas de líquido entre las células que confluyan formando el blastocele, este deberá tener menos de 2/3 del volumen que ocupa la MCI (<50%) y numerosas células tanto en la MCI, como en el trofoblasto embrionario; en el blastocisto y el expandido el blastocele tendrá más del 2/3 del volumen de la MCI, el espacio perivitelino desaparece virtualmente y la ZP se encuentra en franco adelgazamiento; el blastocisto en eclosión se encontrará en reexpansión tras el colapso que la ruptura de la zona pelúcida originó por el cambio osmótico del interior del embrión con el medio exterior, en algunos casos podrá apreciarse a la masa de células interna saliendo de la ZP con un pequeño estrangulamiento o en otros casos no será apreciable el blastocele dado que el fenómeno de eclosión es reciente y podría confundirse con una mórula compacta de no tener en cuenta el grosor de la ZP y por último, el blastocisto eclosionado no se encuentra rodeado de la ZP pero se reconoce el blastocele en la mayoría de los casos. Cualquier evidencia de parches necróticos, agregación de retículo endoplásmico liso, citoplasma oscuro no relacionado a depósito de lípidos, núcleos múltiples o

fragmentación extensiva se considerará como signo de degeneración y mala calidad (Shea, 1981; Park *et al.*, 2006; Sjöblom *et al.*, 2006). De entre los criterios menos selectivos, algunos eligen dar un valor numérico basado en el porcentaje de la MCI y el trofoblasto embrionario con apariencia normal o saludable, señalando que cuando menos debe haber un 50% de células intactas para considerar a un embrión como viable (Duke *et al.*, 2004).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la fertilidad y la prolificidad en ovejas receptoras de embriones congelados lentamente o vitrificados.

Objetivos específicos

Recolectar embriones ovinos y criopreservarlos mediante dos técnicas, la congelación lenta y vitrificación.

Revitalizar embriones congelados lentamente o vitrificados y evaluar en las receptoras los parámetros de fertilidad y prolificidad.

IV. HIPÓTESIS

Dado que la criopreservación por vitrificación origina menor daño a las células embrionarias, los parámetros de fertilidad y prolificidad serán superiores en las ovejas receptoras de dichos embriones.

V MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de la muestra, compuesta por embriones ovinos, derivados *in vivo*, se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) de la FMVZ de la UNAM, ubicado en Tres Marías, Municipio de Huitzilac, Estado de Morelos, a una altitud de 2839 metros sobre el nivel del mar, sus coordenadas son 19° 3'8'' N y 99° 14'35'' E. Para ello se utilizaron veinte donadoras y cuarenta y cuatro ovejas receptoras de razas europeas, Dorset y Suffolk, durante la plena temporada reproductiva (meses de agosto a noviembre).

El diseño experimental contempló que las ovejas donadoras fueran sometidas a un programa de producción de embriones *in vivo*, para que en las próximas 4 a 5 h de la recolección y evaluación morfológica (Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*, 2004a; Cuello *et al.*, 2004b), los embriones resultantes fueron asignados a uno de dos tratamientos de criopreservación embrionaria: congelación lenta (CL) y vitrificación (VIT). Los embriones ovinos recolectados el día 7 posterior al estro, en estadio de mórulas (iniciales y compactas) y blastocistos, de calidades 1 (excelentes y buenos) y 2 (regulares), sometidos a ambos métodos de criopreservación, fueron posteriormente transferidos por pares de manera aleatoria a sus respectivas receptoras (n=21 para CL y n=23 para VIT), en las cuales se determinaron la fertilidad y la prolificidad.

Tratamiento hormonal de las donadoras.

Veinte ovejas Dorset y Suffolk, fueron usadas como donadoras de embriones. Para lograr la sincronización se utilizaron dispositivos vaginales conocidos como CIDR por 12 días (de las siglas en inglés Control Internal Drug Release) impregnados con 300 mg de progesterona*; mientras que para la superovulación se administraron 200 mg de Hormona Folículo Estimulante (FSH) de origen porcino**, dividida en dosis decrecientes aplicadas dos veces al día, durante 4 días.

Las dosis comenzaron a administrarse por vía intramuscular de acuerdo al siguiente esquema: dos días antes de retirar el CIDR una dosis de 40 mg por la mañana y otra de

* Eazi-breed CIDR G. Dispositivo vaginal con progesterona al 9% (0.3 g) InterAg N.Z.

** Folltropin .V. Extracto de FSH purificado de pituitarias porcinas (400 mg). Bioniche. Ontario Canada

30 mg por la tarde, un día previo al retiro se aplicaron dos dosis de 30 mg, el día del retiro en la mañana, se administraron 30 mg y por la tarde 20 mg y un día después del retiro dos dosis de 10 mg por la mañana y tarde respectivamente, siempre que no se encontraran ya en celo, en cuyo caso el programa se daba por terminado. Utilizando un macho celador con mandil, se detectó estró en todo el grupo, tres veces al día iniciando a las 24 horas de retirado el CIDR y toda oveja que presentó estró conductual (día 0 del ciclo estral) recibió monta natural de manera dirigida con un semental de probada fertilidad y previo análisis espermático, cada 8 horas, mientras permaneció receptiva.

Recolección de embriones

La recolección se realizó el día 7 posterior a la aparición del estró por laparotomía media ventral, de acuerdo con la técnica descrita por Baril (1995), con modificaciones (Kraemer, 1989; Thibier y Nibart 1992).

Para tal efecto, se sometió a las donadoras a anestesia general disociativa bajo 36 h de restricción de alimentos sólidos y 24 h de privación de agua para evitar el riesgo de regurgitación y broncoaspiración. La tranquilización se llevó a cabo mediante la administración intramuscular de 0.45 mg de xilazina al 2%/kg de peso corporal y como anestésico se aplicó ketamina (2 mg/kg de peso corporal) por vía intravenosa 10 minutos después de la inyección de xilazina. Una vez que surtió efecto la anestesia, el animal fue sujeto a una camilla de recolección en posición decúbito dorsal, se le cubrió la cabeza, se rasuró, lavó y desinfectó la región abdominal para posteriormente realizar una incisión de aproximadamente 3 cm de largo y 3 cm anterior a la ubre sobre línea media. Se observó la respuesta superovulatoria y se exteriorizó el aparato reproductivo, manteniéndolo humectado con solución salina tibia para evitar adherencias futuras.

Posteriormente, en cada cuerno uterino se insertó una sonda Foley (calibre 10Fr) en la luz de la base del cuerno mediante una punción realizada con un catéter intravenoso (14G x 5½) para infundir y recuperar mediante ella el medio de lavado*. Posteriormente, a través de otro catéter intravenoso (18Gx 5¼) insertado en la punta del lumen del cuerno uterino, se administraron 40 mL del medio de lavado y con ayuda de la gravedad y un masaje gentil, se recuperó el líquido que fluía de la sonda a un filtro concentrador.** Una vez terminado el procedimiento en cada cuerno , se colocó un punto de sutura absorbible de 4-0 en cada una de las incisiones del útero, se regresó el aparato reproductivo a la cavidad abdominal y se suturó la incisión abdominal. Al mismo tiempo y lo antes posible después de su recolección, el líquido contenido en el filtro concentrador* fue vertido en una caja de búsqueda, se esperaron un par de minutos para dejar sedimentar los embriones y se observó cuidadosamente bajo el microscopio estereoscópico a baja resolución 2x. Los embriones hallados fueron separados, lavados y conservados en PBS enriquecido o solución de mantenimiento** durante su evaluación morfológica y se seleccionaron para ser asignados aleatoriamente a una metodología de criopreservación (congelación lenta o vitrificación), las mórulas (iniciales y tempranas) o blastocistos, de calidades 1 (excelente y buena) o 2 (regular) de acuerdo con Shea (1981). Así, de 104 embriones recolectados, sólo 92 fueron criopreservados; 45 mediante congelación lenta y 47 mediante vitrificación.

Criopreservación de embriones.

Congelación lenta. En 45 embriones, se utilizó el método general o tradicional, desarrollado por Willadsen y colaboradores (1974) con ligeras modificaciones de acuerdo a otros autores (Maurer, 1978; Massip *et al.*, 1982; Massip *et al.*, 1987; Lehn Jensen y Greeve 1982; Martínez *et al.*, 2002b). Los embriones procedentes de una misma donadora, solos o en pares, se expusieron en un solo paso al medio de congelación (PBS con 10 % de glicerol más sacarosa y albúmina sérica bovina,BSA) a temperatura ambiente (20-22°C) por 10 minutos, incluyendo el tiempo que tomó identificar y envasar todos los embriones en una pajilla plástica irradiada de 0.25 mL. La

* Vigro complete flush solution. AB Technology. U.S.A.

* Em Con filter. Embryo concentrator gamma irradiated. ImmunoSystems Inc.WI. USA

** Em Care holding medium. Agtech Inc., KS, USA.

forma en que se envasó la pajilla fue utilizando dos columnas de medio “holding” que rodeaban una columna más pequeña de medio de congelación de un solo paso que contenía al o a los embriones y que estaban separadas mediante pequeñas burbujas de aire. Posteriormente se colocaron en una congeladora de embriones programable**, siguiendo el programa 1 de congelación que consiste en una exposición inicial de -6°C que permaneció así durante 2 minutos para equilibrar la temperatura de la pajilla y la de la congeladora. Transcurrido este tiempo se indujo la cristalización al poner en contacto la superficie de la columna próxima superior al embrión empajillado con una pinza de acero enfriado con nitrógeno líquido. Entonces se dejó correr el programa, manteniendo 10 minutos más la temperatura estable a -6°C y posteriormente se disminuyó la temperatura paulatinamente a una velocidad de menos 0.5°C hasta llegar a -32°C en aproximadamente 53 minutos. Una vez alcanzada esta temperatura, las pajillas, se mantuvieron por 10 minutos, posteriormente se retiraron del equipo de congelación y se sumergieron en un termo criogénico con nitrógeno líquido, debidamente colocadas y etiquetadas en sus respectivos goblets y bastones de aluminio, dentro de una canastilla.

Vitrificación. Se utilizó en 47 embriones, el método de vitrificación descrito por Rall y Fahy en 1985 y modificado recientemente por Pryor y colaboradores (Pryor *et al.*,2006; Seidel, 2006). Los embriones provenientes de la misma donadora se colocaron, solos o en pares, y fueron vitrificados utilizando un kit de vitrificación comercial* siguiendo las instrucciones del fabricante. De acuerdo a estas, los embriones se equilibraron por 5 minutos en una microgota del primer medio de vitrificación o medio de equilibrio (V1=holding + 5M etilenglicol=10.8 mL de medio base plus 4.2 mL de etilenglicol) a temperatura de laboratorio (25°C); mientras pasaba este lapso una pajilla irradiada de 0.25 mL fue cargada con una columna del diluyente (diluyente= galactosa 1 M) incluido en el kit y el tapón plástico que sellaría la pajilla fue identificado. Durante el segundo paso, los embriones se colocaron en una gota de 20 µl de medio vitrificante V2 (V2=holding + 7M etilenglicol + 0.5 M galactosa + 18% (w/v) de Ficoll 70= 19.5 mL de etilenglicol, 9 g de Ficoll 70 y 4.5 g de galactosa aforado a 50 mL de medio base),

** Freeze control CL-5500. Cryologic. Vic., Australia

* Bovine vitrification kit. Syngro. Bioniche. WA. U.S.A.

inmediatamente después se envasaron por succión en la misma pajilla plástica antes utilizada separando mediante una burbuja de aire de otra columna de diluyente y sellada en un período no mayor de 45-60 segundos. Finalmente la pajilla fue expuesta verticalmente a vapores de nitrógeno dentro de un goblet inmerso en vapores de nitrógeno por al menos 1 minuto, después sumergida directamente en nitrógeno líquido y posteriormente colocada en su respectivo goblet y bastón de aluminio para introducir las en la canastilla del termo de nitrógeno.

Descongelación o revitalización de embriones

Todos los embriones a transferir se mantuvieron al menos quince días en el termo criogénico con nitrógeno líquido (Renard et al, 1983; Nowshari y Brem, 2000) y posteriormente fueron revitalizados. En el caso de embriones congelados lentamente, la descongelación se llevó a cabo sacando las pajillas del NL, exponiéndolas 10 segundos al aire y sumergiéndolas en agua tibia a 35°C durante 20 segundos. Los embriones fueron descargados a un Caja de Petri para su recuperación, fueron colocados en el medio de descongelación comercial de tres pasos* (concentraciones decrecientes de crioprotectores: paso 1: 6% v/v glicerol, 10.3% w/v sacarosa; paso 2: 3% v/v glicerol, 10.3 % w/v sacarosa y paso 3: 10.3% W/v sacarosa) pasando de 5 a 7 minutos en cada paso, para después lavarlos en PBS-BSA y evaluarlos morfológicamente en cuanto a su grado de desarrollo y calidad.

Para los embriones vitrificados, el proceso de calentamiento directo o entibiamiento, se realizó de acuerdo al método de dilución en pajilla descrito por Leibo (1984) tomando en cuenta las variaciones realizadas por Kuwayama *et al.* (1994). Constó en extraer las pajillas del termo con nitrógeno líquido, mantenerlas durante 10 segundos a temperatura ambiente, sumergir la pajilla en agua a 35°C durante 20 segundos, secarla y agitarla de manera similar que a la de un termómetro de mercurio para mezclar las columnas de diluyente con el embrión.

Transferencia de los embriones.

Los embriones fueron transferidos por pares a cuarenta y cuatro receptoras previamente sincronizadas con esponjas vaginales con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA) durante doce días y 200 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) a su retiro, con las cuales se formaron dos grupos: embriones congelados lentamente (n = 21) y embriones vitrificados (n = 23).

La transferencia se realizó con la ayuda de un endoscopio para exteriorizar el cuerno uterino ipsilateral al ovario que presentó el cuerpo lúteo de mejor calidad. En el cuerno seleccionado se realizó una pequeña punción y se introdujo el embrión previamente cargado en un catéter (Cervantes et al, 2007; Ortiz et al, 2011).

Diagnóstico de gestación.

Cuarenta días después de realizada la transferencia de los embriones, con ambas técnicas CL y VIT, se realizó el diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía de imagen y tiempo real, empleando un transductor lineal de 5.0 Mhz, que se introdujo rectalmente en las ovejas, para verificar la presencia y número de las vesículas embrionarias, el latido cardiaco del feto, así como la cavidad en el útero con presencia de líquido, indicadores de una gestación positiva (Mejía et al, 2011).

Análisis estadístico.

Para comparar las dos técnicas de criopreservación de embriones, se analizaron en las ovejas receptoras los promedios de prolificidad (número de crías) y los porcentajes de fertilidad (número de ovejas gestantes dividido entre el número total de ovejas receptoras). Para comparar los promedios de prolificidad entre ambas técnicas de criopreservación se utilizó una prueba de T de student (Daniel, 2005). Para comparar los porcentajes de fertilidad, se realizó una prueba de independencia de Ji cuadrada para una tabla 2 x 2 (asociación entre dos niveles de fertilidad y dos tratamientos). Adicionalmente se compararon, mediante las mismas herramientas estadísticas, los promedios de prolificidad y los porcentajes de fertilidad entre los embriones clasificados durante la etapa de descongelación y revitalización como calidad 1 y los embriones

clasificados como calidad 2. En todos los casos se consideró un nivel de error de tipo I = 0.05 (Daniel, 2005; SAS,1988).

VI. RESULTADOS

Se obtuvieron 5.2 ± 1.3 embriones por donadora. Del total de 104 embriones, se descartaron 16 embriones: 9 clasificados como calidad grado 3 antes de la criopreservación, 3 como ovocitos, y 4 como calidad grado 3 después de la descongelación. La tabla I muestra los resultados obtenidos en las donadoras y la clasificación de embriones para su posterior transferencia.

TABLA 1. Número y grado de desarrollo de los embriones recuperados de las donadoras.

CALIDAD	Mórulas Iniciales	Mórulas Compactas	Blastocisto Inicial	Blastocisto	Ovocitos	TOTAL
1	5	7	9	11	--	32
2	7	15	16	18	--	56
3 y 4	1	3	3	6	3	16
						104

En las receptoras de embriones congelados lentamente, la fertilidad fue de 61.9% (13 gestantes de 21 transferidas), mientras que para las receptoras de embriones vitrificados la fertilidad fue de 65.22% (15 gestantes de 23 transferidas), sin que se encontraran diferencias entre estos valores ($P = 0.82$). La prolificidad en las receptoras de embriones frescos congelados lentamente fue de 1.19, mientras que la prolificidad en las receptoras de embriones vitrificados fue de 1.30. Como en el caso de la fertilidad, no se encontraron diferencias en los valores de prolificidad entre ambos tratamientos ($P = 0.7$) (Tabla 2).

TABLA 2. Porcentaje de Fertilidad y promedio (\pm error estándar) de prolificidad en las receptoras de embriones criopreservados por congelación lenta o vitrificación.

GRUPO	FERTILIDAD	PROLIFICIDAD
Receptoras de embriones congelados lentamente (n=21)	61.90% ^a (13/21)	1.19 \pm 0.21 ^a
Receptoras de embriones vitrificados (n=23)	65.22 ^a (15/23)	1.30 \pm 0.20 ^a

^a para una determinada variable, valores con la misma literal no son diferentes (P > 0.05).

La tabla 3 muestra el porcentaje de fertilidad y los promedios de prolificidad de ovejas con embriones transferidos de calidad 1 ó 2. No se encontraron diferencias en los valores de prolificidad (P = 0.9) y fertilidad (P = 0.9) entre las ovejas transferidas con embriones de calidad 1 ó 2.

TABLA 3. Porcentaje de Fertilidad y promedio (\pm error estándar) de prolificidad en las receptoras de embriones con calidad 1 o 2.

GRUPO	FERTILIDAD	PROLIFICIDAD
Receptoras de embriones con CALIDAD 1 (n=16)	62.50% ^a (10/16)	1.25 \pm 0.25 ^a
Receptoras de embriones con CALIDAD 2 (n=28)	64.28 ^a (18/28)	1.25 \pm 0.18 ^a

^a para una determinada variable, valores con la misma literal no son diferentes (P > 0.05).

VII. DISCUSIÓN

Todos los métodos de criopreservación responden a requerimientos particulares, pero en general siguen un mismo patrón de congelación: exposición a sustancias crioprotectoras, envasamiento del espécimen de acuerdo a su naturaleza, disminución de la temperatura a una velocidad determinada y la exposición directa al NL, para permanecer ahí por tiempo indefinido hasta su empleo. Por ello existen puntos clave a controlar que son fuente de variación como: tipo celular a criopreservar, volumen de la muestra, crioprotector a elegir, su concentración, combinación con otras sustancias, su método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio; la velocidad de enfriamiento, necesidad de dilución del crioprotector para extraerlo de las células y velocidad de entibiamiento. Todas estas variables están relacionadas de algún modo con la permeabilidad y toxicidad de los crioprotectores y la regulación del criodaño (Schneider y Mazur 1984; Rall, 1987; Schiewe *et al.*,1991; Miyake *et al.*,1993; Dinnyés *et al.*,1994; Tervit *et al.*,1994; Kasai, 1996; Arav *et al.*,2000; Papis *et al.*,2000; Kong *et al.*,2000; Massip, 2001;Tran *et al.*,2004; Meryman, 2007

La congelación lenta con glicerol tiene ventajas relevantes como el aprovechamiento de la baja toxicidad de este crioprotector y la alta permeabilidad de los embriones a los glicoles, la uniformidad en los resultados obtenidos, la alta disponibilidad del equipo necesario, el gran número de embriones que pueden ser procesados por ciclo y la diversidad de especies animales en las que se ha aplicado con éxito (Pollard y Leibo 1994; Seidel y Walker 2006; Mucci *et al.*, 2006; Mazur *et al.*, 2008). Los porcentajes de fertilidad registradas en ovinos con esta técnica alcanzan un constante 60% aunque el rango oscila entre 30 al 70% (Massip *et al.*, 1979; Renard *et al.*, 1983; Massip *et al.*, 1987; Sakul *et al.*, 1993; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1994; Caballero *et al.*, 1995; Dobrinsky, 1996; Martínez *et al.*, 2002a; Pryor *et al.*, 2006). Su mayor inconveniente es sin duda su alto costo, aún cuando no se invierta en un equipo de congelación

programable, sumado a la imposibilidad de congelar estructuras con mayor criosensibilidad (Maurer, 1978; Vajta *et al.*, 1996b).

La congelación lenta de embriones provoca cambios como la pérdida de células del trofoblasto y de la MCI, distorsiones morfológicas, degeneración de organelos, extrusión nuclear, alteraciones membranales o la deshidratación del citoesqueleto (Shea, 1981; Lehn-Jensen y Greve 1982; Kasai, 1996; Kaidi *et al.*, 2000; Cocero *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2000; Celestinos y Gatica 2002; Mucci *et al.*, 2006). Muchos de ellos son ocasionados por el proceso en sí aunque son controlables, por ejemplo, aunque la cristalización o “seeding” controle el tamaño de los cristales de hielo al inducirse un estado de superenfriamiento, también origina daños asociados al calor latente resultante de la fricción de tales cristales durante el reordenamiento molecular y así, supone una fuerza opuesta al punto de congelación, por lo que para evitarlo se recomienda realizar la cristalización a temperaturas bajo cero en células lo suficientemente deshidratadas (Celestinos y Gatica 2002; Meryman, 2007).

La vitrificación tiene múltiples ventajas, entre ellas, la disponibilidad de un proceso simple, económico, adaptable a condiciones de campo y que no implica la adquisición de equipo especial. Además el vitrificar un lote de embriones puede tomar de 7 a 10 minutos, pudiendo aplicarse a estructuras criosensibles con las que la CL no ha tenido resultados favorables, a embriones manipulados de manera invasiva o con la (ZP) fracturada o a tejidos y órganos completos para su posterior trasplante, y por último, se pueden formular medios de vitrificación sin derivados de origen animal (Miyake *et al.*,1993; Széll y Windsor 1994; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*,1994; Vajta *et al.*,1996a; Vajta *et al.*,1996b; Saha *et al.*,1996; Kasai 1996; Booth *et al.*,1998; Peura *et al.*,1999; Celestinos y Gatica 2002; Cuello *et al.*,2004b; Seidel y Walker 2006; Smith *et al.*,2006; Wang *et al.*,2007). La vitrificación produce índices de fertilidad variables de acuerdo a la metodología de vitrificación. En el caso del ovino, la vitrificación OPS ha resultado en porcentajes de fertilidad del 20 al 70 y tasas de desarrollo en cultivo del 50 al 95% (Papadopoulos *et al.*,2002; Dattena *et al.*,2004; Guignot *et al.*,2006), mientras que utilizando pajillas plásticas de 0.25 cc se pueden encontrar tasas de fertilidad entre el 13 y 70% y de desarrollo en cultivo de 57 y 100%

(Schiewe *et al.*,1991; Traldi *et al.*,1999; Dattena *et al.*,2000; Massip, 2001; Dattena *et al.*,2004; Guignot *et al.*,2006).

La congelación lenta y la vitrificación de embriones ovinos de razas europeas, de calidad excelente y buena o regular (1 ó 2), constituyen una buena práctica para tratar de garantizar mejores resultados al realizar la transferencia embrionaria (Massip *et al.*, 1982; Vajta *et al.*, 1996a; Celestinos y Gatica, 2002). El periodo óptimo para realizarla se encuentra entre las 4 a 5 horas posteriores a la recolección, ya que después de ese tiempo la viabilidad disminuye con relativa rapidez (Shea, 1981; Fahning y García, 1992; Celestinos y Gatica, 2002; Cuello *et al.*, 2004a).

Es conocido que los embriones que son congelados lentamente y también los que son vitrificados presentan daño celular, aunque en menor medida con esta última técnica, lo que significa que cualquier proceso de criopreservación origina daño en las células embrionarias, el cual se verá reflejado en menor fertilidad y subsecuente prolificidad de las receptoras de embriones crioconservados. De ahí la importancia de llevar a cabo la congelación lenta y la vitrificación, con los procedimientos y tiempos descritos, para minimizar los efectos indeseables. En el presente trabajo, se siguieron estrictamente los protocolos establecidos para cada técnica, lo que confiere un alto nivel de confianza a los resultados obtenidos.

De acuerdo a los resultados reportados por diversos grupos de investigadores, los estadios adecuados para que los embriones de rumiantes domésticos, logren con éxito los procedimientos de la congelación lenta y la vitrificación en pajillas francesas de plástico de 0.25 mL, con etilenglicol y/o sacarosa como crioprotectores corresponde idealmente a los de mórula compacta y hasta blastocisto (Shea, 1981; Massip *et al.*, 1989; Miyake *et al.*, 1993; Cocero *et al.*, 2000; Massip, 2001; Martínez *et al.*, 2002b; Balasubramanian y Rho, 2006; Seidel y Walker, 2006; Horlacher y Brem, 1994; Kasai, 1999; Celestinos y Gatica, 2002). Sin embargo, el recolectar y utilizar únicamente este tipo de embriones es complicado, ya que se necesitaría entonces una mayor cantidad de donadoras, lo cual en muchas ocasiones es difícil conseguir. A pesar de que en el presente trabajo también se utilizaron mórulas tempranas para ambas metodologías de congelación, la fertilidad y la prolificidad no se vieron afectadas de manera importante.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos para la congelación de mórulas y blastocistos (7 días de edad) con ambas técnicas, congelación lenta y vitrificación, con un protocolo de tratamiento hormonal en donadoras y receptoras de embriones ovinos, son satisfactorios y similares a lo reportado anteriormente por diversos investigadores. Tanto la congelación lenta como la vitrificación, son viables para su empleo en la transferencia de embriones ovinos, presentando ciertas ventajas la vitrificación en relación a los costos, ya que se adapta más fácilmente a ser realizada bajo condiciones de campo, no así en los parámetros evaluados de fertilidad y prolificidad, donde los resultados del presente trabajo, no presentan diferencias significativas y caen dentro de los rangos reportados, ya que la fertilidad en receptoras rumiantes de embriones congelados lentamente es del 50 al 60%, mientras que la de los vitrificados presenta una mayor variación con fertilidades , entre un 30 a un 65% (Guignot *et al.*, 2006).

Aunque habría que considerar que la vitrificación crece en popularidad principalmente en el área de reproducción asistida en humanos y por supuesto en los animales de producción y compañía, sin descartar aplicaciones prácticas en fauna silvestre. La vitrificación ofrece un amplio futuro en diversas líneas de investigación afines a la técnica y su transferencia a los productores de rumiantes domésticos.

No se encontró un efecto del método de criopreservación y calidad de los embriones, empleados en el trabajo, sobre la fertilidad (positivo a gestación) y la prolificidad (crías nacidas) de las receptoras.

Debido a que no se pudieron conformar todos los pares de embriones transferidos con ejemplares en la misma fase de desarrollo, no fue posible comparar de manera puntual los parámetros de fertilidad y prolificidad entre fases de desarrollo de los embriones criopreservados por ambas técnicas. Se recomienda la realización a futuro de un estudio específico para contestar esta pregunta de investigación, ya que se requiere de un mayor número tanto de donadoras como de receptoras para conformar un elevado número de pares de embriones en el mismo estadio de desarrollo. También es de especial interés para futuros trabajos, incluir diferentes tipos de envases, para la criopreservación de embriones ovinos.

VIII CONCLUSIONES

Tanto la congelación lenta, como la vitrificación, pueden ser contempladas para la crioconservación de embriones ovinos. No se encontró un efecto del método de criopreservación de los embriones, sobre la fertilidad y la prolificidad de las receptoras. Tampoco se encontraron diferencias en la fertilidad ni en la prolificidad entre las receptoras de embriones de calidad 1 o 2. Ello comprueba que ambas calidades pueden ser utilizadas con éxito en programas de transferencia de embriones que utilicen congelación lenta o vitrificación como técnicas de criopreservación.

Hay que considerar que la vitrificación, de acuerdo a investigaciones recientes en diversas especies animales y por sus resultados, es una solución para incrementar el uso de la técnica y transferir sus múltiples beneficios, a los productores de ovinos, principalmente a los criadores de razas especializadas o líneas genéticas de alto rendimiento.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los alcanzados en otros trabajos, ya que la fertilidad en receptoras rumiantes de embriones congelados lentamente es del 50 al 60%, mientras que la de los vitrificados presenta una mayor variación con fertilidades entre un 30 a un 65%. .

IX. LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

ADN ácido desoxirribonucleico
BSA albúmina sérica bovina del inglés *Bovine Serum Albumin*
CL congelación lenta con glicerol
DCI índice de muerte celular del inglés *death cell index*
DMSO dimetilsulfóxido
EG etilenglicol
FCS suero fetal bovino del inglés *Fetal Calf Serum*
ICSI inyección intracitoplasmática de espermatozoides del inglés *intracytoplasmic sperm injection*
IETS International Embryo Transfer Society
IGFIR receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I
IVD *in vivo* derived
IVP *In vitro* produced
OPS Open Pulled Straw
PEG polietilenglicol
PG propilenglicol
PVP polivinilpirrolidona
SOPS Superfine Open Pulled Straw
TE transferencia embrionaria
UV ultravioleta
VIT vitrificación en pajillas de 0.25cc
ZP zona pelúcida

X. LITERATURA CITADA

- Abd El Razek I.M, Charpigny G, Kodja S, Marquant-Leguienne B, Mermillod P, Guyader-Joly C, et al. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2000;53:346.
- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Abas Mazni O, Rutledge JJ. Post-thaw survival and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification. *Theriogenology* 1994;41:154.
- Albarracín JL, Morato R, Rojas C, Mogas T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 2005;63:890-901.
- Arav A, Zeron Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 1997;47:341.
- Arav A, Zeron Y, Ocheretny A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows succesful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 2000;53:248.
- Balakier H, Cabaca O, Bouman D, Laskin C, Squire JA. Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism. *Human Reprod.* 2001;15:2404-2410.
- Balasubramanian S, Rho GJ. Effect of chilling on the development of in vitro produced bovine embryos at various cleavage stages. *Theriogenology* 2006;23:55-61.
- Baril G, Brebion P. y Chesné P. compiladores Estudio FAO producción y sanidad animal 115: Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Italia (Roma): FAO, 1995.
- Beebe LF, Cameron RD, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. Piglets born from vitrified zona-intact blastocyst. *Theriogenology* 2000;53:249.
- Betteridge K.J. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 1995;41:1061-1098.
- Betts D.H., King W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 2001;55:171-191.
- Booth PJ, Vajta G, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification of both cytoplasts and day 3 embryo donors in bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 1998;49:384.
- Buckrell BC, Gartley CJ, Johnson WH. Results of a commercial sheep embryo transfer program. *Theriogenology* 1989;31:178.
- Caballero GV., Saharrea MA., Balcázar SA., Mejía VO, Zarco QL., Valencia MJ. Fertilidad de embriones frescos y congelados transferidos por laparoscopia en cabras. *Vet. Mex.* 1995;26:366.

- Cabodevila J, Teruel M. Biotecnología de la reproducción. Criopreservación de embriones bovinos. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.2001.pp 149-174.
- Campos-Chillón LF, Walker DJ, De la Torre-Sánchez JF., Seidel GE. In vitro assesment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology* 2006;65:1200-1214.
- Celestinos M, Gatica R. Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Arch. Med. Vet.* 2002;34:1-12.
- Chen J.C., Ji W.Z., Shang E.Y., Yang S.C., Zou R. Cryopreservation of kumming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols. *Theriogenology* 1994;41:174.
- Christensen LC. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology* 1991;35:141-149.
- Cocero M.J., Moreno S., Aguilar B. Ultrastructure of in vivo-produced sheep embryos after cryopreservation in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 2000;53:250.
- Cognie Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:105-116.
- Cuello C, Gil MA., Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 2004a;62:1144-1152.
- Cuello C, Gil MA., Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, *et al.* Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* 2004b;62:351-361.
- Daniel, W.W. 2005. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed. Ed. Limusa. México, D.F. 755 pp
- Dattena M, Accardo C, Pilichi S, Isachenko V, Mara L, Chessa B. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro derived. *Theriogenology* 2004;62:481-493.
- Dattena M, Ptak G, Loi P, Cappai P. Lambing rate following transfer after vitrification of in vitro- and in vivo-produced ovine embryos. *Theriogenology* 2000;53:252.
- Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Effect of ethylene glycol concentration and exposure time on post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo oocytes. *Theriogenology* 2000;53:253.
- Dinnyés A, Carolan C, Lonergan P, Solti L, Massip A, Mermillod P. In vitro survival of in vitro produced (IVP) bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology* 1995;43:197.
- Dinnyés A, Keefer CL, Stice SL, Solti L, Vajta G, Macháty Z, *et al.* Vitrification of IVMFC bovine embryos in VS3a and EFS solutions: a preliminary report. *Theriogenology* 1994;41:189.

- Dobrinsky J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996;45:17-26.
- Duke M, Basile N, Johnson M, Copperman A, Sandler B, Barritt J. Hatched blastocysts that collapse during slow freezing have higher post-thaw survival rate. *Fertil. Steril.* 2004;82:S150 abstract P41.
- Fahning ML, García MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 1992;29:1-18.
- Gandolfi F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1994;41:95-100.
- Guerin B. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology* 1997;47:33-42.
- Guignot F, Bouttier A, Beril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers JF, *et al.* Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology* 2006;66:1004-1011.
- Hochi S, Akiyama M, Kimura K, Hanada A. Vitrification of in vitro-matured bovine oocytes in open-pulled glass capillaries of different diameters. *Theriogenology* 2000;53:255.
- Holt W.V. Alternative strategies for long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997;9:309-319.
- Horlacher W, Brem G. Comparison of 3 different vitrification methods for cryopreserving mouse embryos. *Theriogenology* 1994;41:218.
- Horvarth G, Seidel GE. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. *Theriogenology* 2006;66:1026-1033.
- IETS. 2009. Certificate of embryo recovery/Certificate of embryo transfer/Certificate of freezing (printable form).
- Ishwar AK, Memon MA. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rumin. Res.* 1996;19:35-43.
- Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Sekimoto A, Nagao Y, Kato M, *et al.* Effect of linoleic acid albumin on the developmental potential of embryos produced by nuclear transfer into frozen-thawed bovine cytoplasts. *Theriogenology* 2000;53:256.
- Jung YJ, Lee JH, Kook MJ, Choi KW, Lee SJ, Kim J.W. Comparative study of embryo development and apoptosis vitrification vs. slow freezing of biopsed mouse embryo. *Fertil. Steril.* 2008;88:345 abstract P716.
- Juriscova A., Detmar J., Caniggia I. Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 2005;75:262-280.
- Kader A, Abdelrazik H, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. Effect of zonal hatching on expanded and non-expanded blastocysts vitrification. *Fertil. Steril.* 2007a;88:93 abstract O249.

- Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Falcone T, Goldberg J, Sharma R. Improvement in expanded blastocyst vitrification outcome by the use of a pre-vitrification intervention and non-intervention technique. *Fertil. Steril.* 2007b;88:93 abstract O248.
- Kaidi S, Donnay I, Dessy F, Massip A. Effect of freezing or vitrification on the quality of in vitro-produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 2000;53:257.
- Kanagawa H. Freezing of mammalian ova. *Cryobiology* 1978;15:680.
- Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:67-75.
- Kasai M. Vitrification: Refined strategy of the cryopreservation of mammalian embryos. *J. Mamm Ova Res* 1997;14: 17-28.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai Y, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J ReprodFert* 1990;89:91-97.
- Khurana NK, Niemann H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* 2000;54:313-326.
- Kobayashi S, Tomita M, Pollard JW, Leibo SP. Survival of cryopreserved porcine embryos vitrified in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 1994;41:228.
- Kong IK, Lee SI, Im YT, Cho S, Ohh HJ, Ohh DH. Improvement of post-thaw hatching rates of in vitro-produced bovine embryos vitrified by ultra-mini straw. *Theriogenology* 2000;53:258.
- Kraemer DC. Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology* 1989;31:141-148.
- Kuleshova L, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil. Steril.* 2002;78:449-454.
- Kuwayama M, Tasaka M, Hamano S. In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994;41:231.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility* 1999;72: 1073-1078.
- Lehn-Jensen H, Greve T. The survival of cow blastocysts frozen in 1.4 M glycerol after plunging between -15 and -60°C and rapid thawing. *Theriogenology* 1982;17:95.
- Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984;21:767-790.
- Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993;39:81-94.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:45-53.

- Leibo SP, Pollard JW, Martino A. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1995;43:265.
- Lewis IM, Lane MW, Vajta G. Pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos vitrified by open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology* 1999;51:168.
- Martínez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, De las Heras MA. Pregnancy rates transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology* 2002a;58:962-972.
- Martínez AG, De Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1998;50:757-767.
- Martínez AG, Valcárcel A, De Las Heras MA, De Matos DG, Furnus C, Brogliatti G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Anim. Reprod. Sci.* 2002b;73:11-21.
- Massip A. Review: Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* 2001;36:49-55.
- Massip A, Van Der Zwalmen P, Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 1987;27:69-79.
- Massip A, Van der Zwalmen P, Ectors F, De Coster R, D'Leteren C, Hanzen C. Deep freezing of cattle embryos in glass ampules of french straws. *Theriogenology* 1979;12:79-84.
- Massip A, Van Der Zwalmen P, Hanzen C, Ectors F. Fast freezing of cow embryos in french straws with an automatic program. *Theriogenology* 1982;18:325-332.
- Massip A, Van Der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.* 1989;19:117-129.
- Maurer RR. Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. *Theriogenology* 1978;9:45-68.
- Mazur P, Koshimoto C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates? *Biol. Reprod.* 2005;66:1485-1490.
- Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status and future directions. *Biol. Reprod.* 2008;78:2-12.
- Mazur P, Schneider U, Mahowald AP. Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology* 1991;29:39-68.
- McCracken JE, Wilmut I, Young LE. Temporary in vivo culture in ligated sheep oviducts effect on fetal size and development. *Theriogenology* 2000;53:279.
- McEvoy TG. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod. Domest. Anim.* 2003;38:268-275.
- Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 2007;47:935-945.

Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993;40:121-134.

Mucci N, Aller J, Cabodevila j, Kaiser G, Hozbor F, Alberio RH. Criopreservación de embriones bovinos. *Taurus Bs As* 2007; 7 (26): 20-35.

Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 2006;65:1551-1562.

Nagashima H, Kashiwasaki N, Ashman R, Grupen C, Seamark RF, Nottle M. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 1994;41:113-118.

Naitana S, Bogliolo L, Ledda S, Leoni G, Madau L, Falchi S, *et al.* Survival of vitrified mouflon (*Ovis musimon*) blastocysts. *Theriogenology* 2000;53:340.

Nowshari MA., Brem G. Effect on thawing temperature and in-straw dilution of cryoprotectant on survival and development of murine embryos frozen by a rapid-freezing procedure. *Theriogenology* 2000;53:261.

Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.* 2006;14:127-149.

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

Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000;54:651-658.

Peura TT, Vajta G, Lane MW, Boekel KN, Trounson AO. Vitrification of bovine cytoplasts for nuclear transfer. *Theriogenology* 1999;51:211.

Polge C, Wilmut I, Rowson LE. The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiology* 1974;11:560.

Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994;41:101-106.

Pollard JW, Leibo SP. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993;39:287.

Pryor JH, Looney CR, Walker D, Seidel GE, Hasler JF, Kraemer DC, Romo S. Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of in vivo embryos from brahman cattle. *J. Rep. Fert. Dev.* 2006;52suppl:abstract 215.

Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987;24:387-402.

Renard JP, Heyman Y, Leymonie P, Plat JC. Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology* 1983;19:145.

- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland M, Lonergan P. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2002;62:320-327.
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocysts development, cryotolerance and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 2003;68:236-243.
- Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 2001;56:1-16.
- Romo S, Ducomb YC, Alvarez AL, González F. Guía fotográfica para la evaluación de embriones bovinos. XXXIII Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Mex. pp 468-473.2008.
- Saha S, Boediono A, Sumantri C, Murakami M. Vitrification of bovine in vitromatured and pronuclear oocytes with different vitrification solutions. *Theriogenology* 1996;45:179.
- Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Cece S, Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology* 1995;43:311.
- Sakul H, Bradford G.E., BonDurant RH., Anderson GB, Donahue SE. Cryopreservation of embryos as a means of germ plasm conservation in sheep. *Theriogenology* 1993;39:401-409.
- SAS.Statistical Analysis System.In : SAS/STAT™ User's guide. Release 6.03. Cary,NC,SAS Institute Inc., 1988.
- Scherzer J, Fayrer-Hosken RA, Ray L, Heusner G. A new approach to cryopreservation of large equine embryos by vitrification after blastocoel micromanipulation. *J. Rep. Fert. Dev.* 2006;52suppl:abstract 217.
- Schiewe MC, Hollifield VM, Kasbohm L.A., Schmidt P.M. Embryo importation and cryobanking strategies for laboratory animals and wildlife species. *Theriogenology* 1995;43:97-104.
- Schiewe MC, Rall WF, Stuart LD, Wildt DE. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology* 1991;36:279-293.
- Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984;21:68-79.
- Seidel GE. Embryo transfer: the next 100 years. *Theriogenology* 1991;35:171-180.
- Seidel GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 2006;65:228-235.
- Seidel GE, Elsdon RP, Brink Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology* 1990;33:322.

- Seidel GE, Walker DJ. Pregnancy rates with embryos vitrified in 0.25 ml straws. J. Reprod. Dev. 2006;52suppl:71-76.
- Sell K.M. Viability of frozen tissues. Cryobiology 1978;15:681.
- Semple ME, Betteridge KJ, Leibo SP. Cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. Theriogenology 1995;43:320.
- Shea BF. Evaluating the bovine embryo. Theriogenology 1981;15:31-42.
- Sjöblom P., Menezes J., Cummins L., Mathiyalagan B., Costello M.F. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. Fertil. Steril. 2006;86:848-861.
- Smith GD, Fioravanti J, Hassun PA, Alegretti JR, Motta EL, Serafini P. Prospective randomized controlled study of human oocyte cryopreservation by slow-rate freezing and/or vitrification. Fertil. Steril. 2006;86:S96 abstract O224.
- Széll AZ, Windsor DP. Survival of vitrified sheep embryos in vitro and in vivo. Theriogenology 1994;42:881-889.
- Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology 2000;53:365.
- Tervit HR, Pugh PA, McGowan LT, Bell AC, Wells RW. The freezability of sheep embryos is affected by culture system and source (*in vivo* or *in vitro* derived). Theriogenology 1994;41:315.
- Thibier M, Nibart M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. Anim. Reprod. Sci. 1992;28:139-148.
- Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. Theriogenology 1999;51:175.
- Tran C, Le A, Tan T, Tran A., Ivakhenko V., Behr B. Freezing at lower strating temperature (-6°C) improves human embryo viability and pregnancy rate. Fertil. Steril. 2004;82:132 abstract O329.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. Theriogenology 1997;47:501-509.
- Vajta G, Holm P., Greve T., Callesen H. Cumulative efficiency of biopsy, vitrification and in straw dilution in a bovine in vitro embryo production system. Theriogenology 1996a;45:162.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. Anim. Reprod. Sci. 1996b;45:191-200.
- Vajta G, Kuwayama M, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. Theriogenology 1998;49:176.

- Vajta G, Kunwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;65:236-244.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Booth PJ, Greve T, Callesen H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 1999;51:176.
- Van Der Zwalm P, Touati K, Ectors FJ, Massip A, Beckers JF, Ectors F. Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology* 1989;31:270.
- Van Soom A, Boerjan M. *Editors Assessment of mammalian embryo quality. Invasive and non-invasive techniques.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- Van Wagtendonk-de Leeuw AM, Den Daas JH, Rall WF. Pregnancy rates in a comparative field trials of vitrification and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology* 1994;41:326.
- Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992;37:23-37.
- Wang W, Liu HC, He Z, Tang Y, Rosenwaks Z. All cell types in mouse ovary can be well preserved by vitrification. *Fertil. Steril.* 2007;88:92 abstract O246.
- Whittingham DG. Freezing embryos of laboratory species. *Cryobiology* 1978;15:367-369.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LE, Moor RM. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology* 1974;11:560.
- Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav V. Electrofusion of bovine oocytes with different liposomes changes the membrane thermobehavior and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 2000;53:267.