



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA VIABILIDAD  
DE EMBRIONES CRIOPRESERVADOS EN  
ETILENGLICOL Y GLICEROL, ALMACENADOS EN  
NITRÓGENO LÍQUIDO POR 10 AÑOS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:**

**SOFÍA GUTIÉRREZ SUÁREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
PHD DAVID ALEJANDRO CONTRERAS CARO  
DEL CASTILLO  
MVZ ALLAN ARTURO PÁEZ TREJO**

**2017**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## DEDICATORIA

A mi madre por su incondicional apoyo durante toda mi vida, éste logro es tanto mío como suyo, muchas gracias por todo.

A mi hermana por estar conmigo en todo momento y ser la mejor amiga que tendré en la vida.

A mi tío Luis, por apoyarme y ser como un padre para mí.

A mi gato Peluso y a mi perra Pamela (ambos en paz descansen) quienes estuvieron conmigo desde antes de decidir ser Médico Veterinario, me acompañaron a lo largo de mi carrera y estuvieron a mi lado en las noches de estudio.

Al resto de mi familia que comprendió lo que es realmente la Medicina Veterinaria y la Zootecnia después de que entré a la carrera.

A una gran amiga: Úrsula Lafuente, quien me motivó en todo momento para terminar el presente trabajo.

Al Dr. Jorge Ávila que en paz descansa, quien sin saberlo inició con este proyecto hace varios años.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Páez por darme la oportunidad de colaborar con él en éste proyecto, compartir conmigo sus conocimientos y por ser un buen amigo.

Al Dr. Contreras por toda su asesoría, su enorme paciencia y el apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. Ángel Pulido por darme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del CEIEPAA.

A todos los alumnos y al el personal académico y administrativo del CEIEPAA que colaboró conmigo en la parte experimental de éste proyecto.

Al Señor “Polo” fiel amigo del Dr. Ávila por su desinteresada colaboración y aportación en éste trabajo.

A un gran colega, Miguel Galarde, agradezco sus palabras en los momentos difíciles.

A todas las vacas involucradas en éste proyecto, sin ellas nada de esto sería posible.

## CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Superovulación y recolección de embriones	4
3.2 Morfología y evaluación	9
3.3 Criopreservación	18
3.4 Crioprotectores	20
3.4.1 Crioprotectores penetrantes	22
3.4.2 Crioprotectores No Penetrantes	22
A) Etilenglicol	23
B) Glicerol	23
3.5 Protocolos de criopreservación	24
3.5.1 Método convencional	25
3.5.2 Criopreservación no equilibrada	34
3.6 Alteraciones morfológicas y metabólicas causadas por la criopreservación	36
IV. JUSTIFICACIÓN	39
V. HIPÓTESIS	40
VI. OBJETIVOS	40
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	41
7.1 Localización	41
7.2 Embriones	41
7.3 Selección y sincronización de vacas receptoras	42
7.4 Descongelación de embriones	43

7.4.1 Descongelación de embriones criopreservados con glicerol al 10%	43
7.4.2 Descongelación de embriones criopreservados con etilenglicol	44
7.5 Evaluación de embriones descongelados	44
7.6 Transferencia de embriones	44
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
8.1 Respuesta de hembras receptoras a la sincronización	46
8.2 Evaluación de embriones	46
8.3 Diagnóstico de gestación	54
8.4 Crías logradas	54
<b>IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>55</b>
<b>X. DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>XI. CONCLUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>XII. REFERENCIAS</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Se muestra el protocolo de sincronización para las hembras receptoras de embriones.	42
CUADRO 2. Se muestran las características de ambos grupos de hembras receptoras de embriones.	46
CUADRO 3. Resultados obtenidos de la comparación de embriones criopreservados con glicerol y etilenglicol post-descongelación.	47
TABLA 1. Resultados de la comparación de embriones en glicerol pre y post descongelación.	55
TABLA 2. Resultados de la comparación de embriones en etilenglicol pre y post descongelación.	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Embrión descongelado en glicerol.	48
FIGURA 2. Embrión descongelado en glicerol.	48
FIGURA 3. Embrión descongelado en glicerol.	49
FIGURA 4. Embrión descongelado en glicerol.	49
FIGURA 5. Embrión descongelado en glicerol.	50
FIGURA 6. Embrión descongelado en etilenglicol.	50
FIGURA 7. Embrión descongelado en etilenglicol.	51
FIGURA 8. Embrión descongelado en etilenglicol.	51
FIGURA 9. Embrión descongelado en etilenglicol.	52
FIGURA 10. Embrión descongelado en etilenglicol.	52
FIGURA 11. Embrión descongelado en etilenglicol, no transferible.	53

## 1. RESUMEN

GUTIÉRREZ SUÁREZ SOFÍA. Evaluación comparativa de la viabilidad de embriones criopreservados en etilenglicol y glicerol, almacenados en nitrógeno líquido por 10 años (bajo la dirección de: PhD David Alejandro Contreras Caro del Castillo y MVZ Allan Arturo Páez Trejo).

En el año 2004 en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Bovina y Caprina, el MVZ Jorge Ávila García llevó a cabo un trabajo de súper ovulación y recolección de embriones con ganado lechero de raza Holstein para preservar la genética neozelandesa con que se contaba en ese momento, de los cuales se clasificó y criopreservó únicamente los de calidad 1 (según la Sociedad Internacional de Transferencia de embriones, IETS), utilizando para algunos glicerol y para otros etilenglicol como crioprotector. Actualmente, las necesidades del rancho ahora llamado CEIEPAA y ubicado en Querétaro, en cuanto al incremento en el número de animales del hato lechero e incluir en éste genotipos de alto mérito para la producción, dio la oportunidad para utilizar estos embriones después de 10 años y plasmar en una tesis los resultados de una evaluación comparativa de su viabilidad morfológica tras establecer una clasificación de calidad post-descongelamiento y comparar si existe diferencia con la asignada en el 2004, y si se encuentra variación entre crioprotectores. Se contó con 10 hembras de raza cárnica Limousin como receptoras previamente seleccionadas y sincronizadas, se descongelaron 5 embriones preservados en glicerol y 6 embriones en etilenglicol ya que uno resultó no apto para su transferencia. Tras una evaluación por microscopio estereoscópico para su pronta transferencia se tomaron evidencias fotográficas de cada embrión descongelado para posteriormente realizar un detenido análisis visual y confirmar la decisión tomada previamente. Aunque se tuvieron mejores resultados porcentuales con glicerol tanto en viabilidad (100%) como en tasa de preñez (20% vs 0% obtenido con etilenglicol), el tamaño de la muestra fue muy pequeño por lo que no se pudo realizar un análisis estadístico como se tenía considerado.

## 2. INTRODUCCIÓN

Alrededor del año 1890 gracias a Walter Heape y sus ensayos en conejos, se documentó la primera cría nacida por transferencia de embriones. La primera transferencia de un embrión bovino fue reportado en 1949, y aproximadamente en el año 1950 se logró el primer nacimiento de un becerro en la Universidad de Wisconsin, trabajo que estuvo a cargo de E. L. Willet, et. al., (Hasler, 2014).

La transferencia de embriones (TE) ha sido un paso muy importante en lo que se refiere a la tecnología de reproducción asistida (ART por sus siglas en inglés) siendo el objetivo de ésta herramienta obtener embriones de excelente calidad en las primeras etapas de desarrollo (mórula o blastocisto), provenientes de una hembra de alto valor genético a la cual se realizó un tratamiento hormonal de súper ovulación, para posteriormente, ser depositados (trasplantados) en el útero de una hembra receptora previamente sincronizada y que se encuentra lista para llevar a cabo la gestación (Boiso, 2001). Actualmente existen diferentes maneras de llevar a cabo una transferencia de embriones dependiendo del objetivo que se tenga planteado, puede realizarse en fresco, es decir, trasplantar el embrión una vez que haya sido clasificado como de excelente o buena calidad, o puede ser criopreservado para su posterior uso.

El éxito de la criopreservación de embriones puede depender de diversos factores, siendo uno de ellos el tiempo de criopreservación y el tipo de crioprotector utilizado, ambos pudieran afectar la viabilidad de los embriones bovinos al ser trasplantados posterior a su descongelación; aunque existen estudios en los que se ha evaluado el porcentaje de fertilidad posterior a una criopreservación, la mayoría de ellos no abarca un lapso congelación-descongelación mayor de un año (Larocca, et al., 1997), por lo cual no se puede saber con mayor precisión qué tanto puede llegar a influir un periodo prolongado de criopreservación en la viabilidad de un embrión bovino, y si el tipo de crioprotector en el que se encuentren pudiera influir en el resultado final.

(3)

A partir de éste punto y tras la necesidad del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de aumentar el hato lechero sin introducir animales o embriones provenientes de otros sitios por razones sanitarias, se decidió aprovechar los embriones congelados desde hace más de 10 años en dos diferentes crioprotectores (Glicerol y Etilenglicol) para analizar el efecto a largo plazo de dichos agentes en base a una evaluación morfológica de acuerdo a la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones), y determinar el grado de degeneración celular ocurrido, comparar la clasificación pre y post congelación entre los embriones con glicerol y etilenglicol, así como realizar un registro de la fertilidad obtenida y al mismo tiempo ayudar a cubrir las necesidades del rancho.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Súper ovulación y recolección de embriones

Para llevar a cabo un procedimiento de **TE** se debe iniciar por la selección de hembras donadoras, las cuales deben estar en buen estado de salud y contar con una buena alimentación. Es necesario tener acceso a sus registros reproductivos para poder descartar alguna anomalía, así como asegurarse que la vaca haya presentado por lo menos dos ciclos estrales consecutivos de duración normal antes de ser seleccionada para entrar en un programa de sincronización y posteriormente recibir un tratamiento de superovulación (Gasque, 2008). El tratamiento de superovulación consiste en la administración de hormonas como la Hormona Folículo Estimulante (FSH) o la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) durante la fase de crecimiento de la cohorte de folículos pertenecientes a la segunda oleada folicular, antes de que se establezca un folículo dominante y los folículos subordinados sufran atresia, es decir, de 8 a 12 días después del celo (Mapletoft, 2002; Baruselli et al., 2011). Esto permite rescatar de la atresia a un mayor número de folículos, de manera que puedan seguir su desarrollo y se produzca la ovulación múltiple. No existe un protocolo único para los programas de superovulación ya que el éxito de cada tratamiento es influenciado por diversos factores de la donadora, como puede ser la raza, edad, número de partos y en general su historia reproductiva, así como por aspectos externos al animal, como la nutrición, clima, manejo, calidad del semen, momento de la inseminación artificial y la habilidad del inseminador (Hasler, 2014).

Durante la última década se han desarrollado protocolos en los cuales, antes de la superovulación propiamente dicha, se realizan tratamientos encaminados a sincronizar las oleadas foliculares, de forma tal que el tratamiento súperovulatorio se inicie cuando la oleada folicular se encuentra en la etapa justa para obtener los mejores resultados, tanto en términos del número de ovocitos viables que son ovulados, como del momento en que se llega a la ovulación para obtener la máxima fertilidad con inseminación a tiempo fijo, sin necesidad de detectar

calores. . Este tipo de protocolos son de gran importancia cuando se trabaja con *Bos indicus* o en con un número grande de donadoras de ganado europeo (Márquez et al., 2005).

Existen aspectos importantes a considerar en los protocolos de súper ovulación, uno es el control del inicio de la oleada folicular (emergencia folicular), lo que permite iniciar el tratamiento con gonadotropinas cuando los folículos se encuentran en la etapa más adecuada de su desarrollo. También es deseable controlar el momento en el que se induce la ovulación para poder realizar la inseminación artificial de las donadoras en el momento más adecuado. . Los protocolos también dependerán del tipo de hormona (FSH o eCG) utilizada para súper-ovular, así como la dosis y la frecuencia de administración de las gonadotropinas (Baruselli et al., 2011).

La emergencia de la onda folicular para protocolos de súper ovulación se puede controlar farmacológicamente mediante diferentes hormonas. Uno de los protocolos más utilizados por los profesionales se basa en la administración de estradiol (E2) y Progesterona (P4). En este esquema el estradiol inhibirá la liberación de FSH, lo que inducirá la atresia folicular de todos los folículos de una oleada. Esto permite que, una vez que el estradiol sea metabolizado, se eleve de nuevo la FSH para iniciar una nueva onda folicular, aproximadamente 4 días después de la aplicación de estradiol, por lo que no es necesario esperar de 8 a 12 días para la aplicación de FSH o eCG (Mapletoft, et al., 2007; Baruselli, et al., 2011). Este tratamiento tiene la complicación de que en ciertos países, como EU, Nueva Zelanda y la Unión Europea, se ha prohibido la utilización de estrógenos debido a los posibles residuos en los alimentos, por lo que se han tenido que implementar nuevas estrategias para inducir la onda folicular en el momento que se desea.

Una de estas estrategias es la colocación de un dispositivo intravaginal con P4 para prevenir ovulaciones tempranas y que las donantes no se adelanten al celo, esta acción se combina con la aplicación de Prostaglandina F2 $\alpha$  por vía intramuscular (IM) (Baruselli, 2011) la cual destruirá al cuerpo lúteo presente en

caso de que existiera alguno, esto permitirá que los folículos que se encuentren en desarrollo lleguen a la atresia para comenzar el tratamiento súperovulatorio con el inicio de la segunda onda folicular; otro método consiste en aplicar por vía IM una dosis de GnRH para inducir la ovulación o la luteinización del folículo dominante, seguido de la emergencia de una nueva onda folicular 1 a 2 días más tarde (Macmillan y Thatcher, 1991). El porcentaje de ovulación después de éste tratamiento cuando se aplica en cualquier momento del ciclo, varía de 44.3% (Colazo et al., 2009) a 85% (Pursley et al., 1995).

Para el tratamiento de súper ovulación es de importancia decidir si se empleará FSH o eCG en el protocolo, ya que tanto la forma de administración como los resultados son distintos para cada hormona. En 1978 (Elsden et. al., 1978), se reportó una mejor respuesta súperovulatoria después del tratamiento con FSH más 20% de LH en comparación con el uso de eCG. En forma similar, en 1983 (Monniaux et al., 1983) se observó que la tasa de ovulación y el porcentaje de hembras con más de tres embriones transferibles tiende a ser mejor con el uso de FSH que cuando se emplea eCG.

La principal razón por la cual se hizo más popular la utilización de FSH en lugar de eCG en los protocolos de superovulación se relaciona con problemas asociados a una prolongada estimulación de los ovarios después de la aplicación de eCG, ya que esta hormona persiste hasta por 10 días en la circulación de la vaca. La Gonadotropina Coriónica equina (eCG) es una glicoproteína compleja con una vida media en la circulación de más de 40 h, lo que genera una ventaja práctica, ya que es posible inducir la superovulación con una sola aplicación de la hormona, a diferencia de lo que ocurre cuando se utiliza FSH, en cuyo caso se requieren entre 6 y 8 inyecciones aplicadas con 12 horas de intervalo entre ellas. Sin embargo, la estimulación prolongada provocada por la eCG resulta en un aumento en el número de folículos anovulatorios al momento del lavado ya que continúan creciendo folículos aún después de que se ha producido la ovulación. Los estrógenos producidos por los folículos anovulatorios afectan la eficiencia de la colecta y la calidad de los embriones (González et al., 1994), además lleva

como consecuencias perfiles anormales de LH y progesterona, disminuye la tasa de fertilidad y reduce la calidad de los embriones. (Greve et al., 1983; Bó y Mapletoft, 2014).

En contraste con la larga vida media de la eCG, la vida media de la FSH en la circulación es de 5 horas o menos, por lo que debe administrarse dos veces al día durante 4 días para inducir con éxito la superovulación. La desventaja de esto es que se requiere tiempo y trabajo extra, se causa mayor estrés al animal y el protocolo está más sujeto a errores (Mapletoft et al., 2002). En algunos estudios se ha intentado realizar una sólo una aplicación de FSH al día (durante 4 días) para reducir el estrés y el manejo, pero se ha demostrado que se obtiene mayor éxito con dos aplicaciones al día (Looney et al., 1981; Monniaux et al., 1983; Walsh et al., 1993).

Aun cuando se utilice la misma hormona para inducir la superovulación, diferentes investigadores utilizan distintas variantes con base en la experiencia de cada profesional. Muchos prefieren usar dosis decrecientes de FSH y aplicar PGF2 alfa al tercer o cuarto día de iniciado el tratamiento, otros prefieren administrar FSH después de la aplicación de Prostaglandinas (Mapletoft, 2009). Incluso se ha llegado a aplicar 500 UI de eCG antes de iniciar el tratamiento con FSH, lo cual tiende a incrementar la respuesta súperovulatoria (Caccia et al., 2000). También se han aplicado 200 UI de eCG al final del tratamiento con FSH y LH (Barros et al., 2008).

Por lo regular se prefiere comenzar los tratamientos de súper ovulación durante la segunda onda folicular para asegurar una alta calidad embrionaria. Sin embargo se puede realizar un protocolo para obtener embriones en la primera onda mediante la aplicación de un dispositivo liberador de progesterona más PGF2 $\alpha$  en el día cero y comenzando el tratamiento súperovulatorio en el día 2 (Nasser et al., 2011). Aunque existen muchos métodos para lograrlo, todos los protocolos mencionados anteriormente cumplen con el objetivo esperado en la mayoría de los casos, logrando con éxito la súper ovulación de las hembras donadoras.

(8)

Una vez completado el protocolo de súper-ovulación las vacas donadoras son inseminadas en dos ocasiones a las 12 y 24 horas después de la aparición del estro, y cuando se utiliza de semen sexado se recomienda el uso de dos dosis de semen por cada inseminación.

Independientemente del protocolo utilizado para inducir la superovulación, la recolección de embriones se lleva a cabo al séptimo día post-inseminación. Primero se realiza una palpación de los ovarios para comprobar que presenten varios cuerpos lúteos, lo cual indicará una respuesta positiva al tratamiento y que la hembra donadora es candidata para el lavado. Se recomienda la anestesia epidural para facilitar la manipulación del tracto reproductor del animal sin la presencia de contracciones rectales que pudieran complicar la maniobra. Una vez aplicada la anestesia se realiza un lavado de la región posterior de la vaca utilizando agua, jabón y alguna solución desinfectante, como yodo o Clorhexidina. Posteriormente se introduce por la vagina una sonda Folley calibre 18-24 o una sonda más especializada de dos vías, la cual se debe de encontrar estéril e introducirse junto con un estilete similar al que se utiliza en la inseminación artificial, pasando la sonda por el cérvix y el cuerpo uterino hasta llegar a la bifurcación de los cuernos uterinos, sitio en el que se infla el balón de la sonda de Foley para bloquear el regreso de líquido hacia el cérvix. Después de retirar el estilete se conecta a la sonda una manguera en forma de "Y" para conducir el medio de lavado al interior del animal, utilizando aproximadamente 2 L de DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) adicionado o no con BSA (Bovine Serum Albumin), todo ello contenido en un envase para infusión intravenosa, el cual debe mantenerse a una altura de por lo menos 1 m por arriba de la vaca para proporcionar la presión adecuada y permitir que el medio fluya por gravedad hacia el útero. Antes de iniciar la infusión de líquido es necesario asegurarse que el balón de la sonda ha quedado colocado justo después del cérvix, procediendo a inflarlo o llenarlo con 10 a 20 cc de solución salina estéril al 0.9%. Esto impedirá que la solución depositada regrese hacia el cérvix y salga por el canal vaginal.

Una vez que se ha llenado un cuerno uterino se debe realizar un masaje de manera gentil para despegar todos los embriones posibles y después el fluido que contiene los embriones se deja drenar hacia afuera de la vaca y es colectado a través de un filtro en el que van quedando retenidos los embriones. Una vez concluido el lavado el filtro debe vaciarse dentro de una caja de Petri que contenga un medio de solución de fosfato con 0.4% de BSA, que se añade al medio para disminuir la tensión superficial y evitar que los embriones se mantengan a flote. Es necesario cuidar siempre los aspectos importantes, como mantener un pH de 7.2 a 7.6, osmolaridad de 270 a 310 mOsM/kg), temperatura de 15 a 25°C, o 37°C en incubadora, y concentración de dióxido de carbono atmosférico menor al 5%. , Para mantener condiciones de asepsia se utiliza equipo estéril, y se agrega al medio 100 UI de penicilina G y 50µg/ml de sulfato de estreptomicina o 25 µg/ml de sulfato de gentamicina. En ocasiones se recomienda también agregar antimicóticos (Seidel y Seidel, 1991; Hasler, 2014). A continuación se lleva a cabo la búsqueda de embriones por medio del uso de un microscopio estereoscópico y se traspasan a una pequeña caja de Petri para realizar su evaluación y clasificación.

### **3.2 Morfología y evaluación**

La edad del embrión es establecida a partir del día del estro o día cero, siendo el día 1 el día de la ovulación. Entre 24 y 36 h posteriores a la fertilización el cigoto de una célula se divide en dos células ovals y 24 h más tarde (día 3) el embrión cuenta ya con 4 células. Hacia el día 4 el embrión cuenta con ocho células y es transportado a través del oviducto, para ingresar al cuerno uterino aproximadamente en el día 5, en estadio de 16 células. A partir de éste momento ya es posible obtener el embrión en forma no quirúrgica y evaluarlo de acuerdo a su estadio y calidad. En el día 5 el embrión continúa su desarrollo a 32 blastómeros y su forma es similar a la de una mora, razón por la cual se le denomina mórula temprana. Para el día 6 el embrión llega a los 64 blastómeros o más y es denominada mórula compacta, para el día 7 el embrión ya es un

blastocisto, que se caracteriza por tener una cavidad llena de líquido llamada blastocele y porque las células del embrión se han diferenciado en las células del trofoblasto y las células de la masa celular interna (Boiso, 2001).

En el pasado los embriones eran recolectados desde el día 5 post-estro hasta el día 9 o 10, pero se observó que generalmente sobrevive mejor a la criopreservación si se obtienen alrededor del día 7, por lo que actualmente la recolección se realiza entre los días 6.5 y 7.5, cuando la mayoría de ellos se encuentran entre los estadios de Mórula Compacta (Etapa 4) y Blastocisto (Etapa 6).

Basado en numerosos estudios previos, se puede afirmar que no existen diferencias notables en la tasa de preñez obtenida con embriones recolectados entre los días 5 y 8, sin embargo, los recolectados a partir del día 9 no se consideran transferibles, ya que han comenzado a eclosionar y la tasa de preñez es muy baja cuando se transfieren blastocistos eclosionados (Hasler, 1987; 2011).

Regularmente se prefiere un embrión en etapa de blastocisto para ser transferido, aunque Dochi et al., (1998) obtuvieron mejores resultados con mórulas tempranas que con blastocistos y blastocistos expandidos. Según estos autores los estadios más avanzados son más sensibles a sufrir daño durante la congelación por tener un mayor grado de diferenciación celular y mayor presencia de líquido en el blastocele. En contraste, Prather (1987) sostiene que los estadios más avanzados son los que presentan mejor viabilidad post- descongelación y afirma que el avance en el desarrollo de un embrión implica un grado inherente de viabilidad, lo que le concedería a estos embriones una menor posibilidad de sufrir una degeneración celular.

Existe controversia con respecto al estadio ideal para la transferencia de embriones. Así, en otro artículo (Hasler, 2001) se encontró que en algunos casos los blastocistos tempranos resultaron en un mayor porcentaje de preñez comparado con mórulas, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados,

mientras que otro autor observó que mórulas y blastocistos tempranos resultaron en porcentajes de preñez más elevados que blastocistos expandidos, y un tercer autor (Ariza, 2006) no encontró relación entre el estado de desarrollo y el éxito en la preñez posterior a la transferencia (Ariza, 2006).

Otros estudios han evaluado las tasas de preñez de acuerdo a la etapa de desarrollo de los embriones después de la congelación y descongelación. En uno de éstos se evaluaron 5,287 transferencias de embriones criopreservados en glicerol, sin no encontrarse diferencia en la tasa de concepción entre mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos y blastocistos expandidos (Hasler, 2001); por el contrario, otros estudios encontraron una disminución en la tasa de preñez en los embriones en etapa de blastocisto y blastocisto expandido que habían sido criopreservado en etilenglicol (Dochi et al., 1998; Palma et al., 1998; Caccia, 2003; Bó et al., 2012).

Las tasas de concepción de embriones producidos in vitro (PIV) son más bajas que las de embriones producidos in vivo; alcanzando el porcentaje de preñez más alto con blastocistos expandidos (Hasler, 1998; Lamb, 2005).

Para lograr una tasa de preñez más alta se recomienda que la etapa de desarrollo del embrión esté en sincronía con los días post estro de la vaca receptora, ya que el útero de ésta presentará un ambiente ideal para un embrión que se encuentre en la etapa correspondiente. Además, las vacas receptoras que se encuentran entre el día 6 y 7 del ciclo se encontrará en una etapa del diestro en el que la función del cuerpo lúteo va en aumento y las concentraciones circulantes de progesterona son elevadas., lo que brinda al embrión un medio que le confiere una mayor probabilidad de sobrevivir a una transferencia (Lindner y Wright, 1983; Hasler et al., 1987).

La evaluación de un embrión bovino se realiza normalmente con la ayuda de un microscopio estereoscópico a una ampliación de 50 a 100X. Se debe de observar desde diferentes ángulos para lograr una mejor perspectiva tanto del embrión como de sus componentes. Para evaluar la viabilidad morfológica se deben tomar

en cuenta parámetros importantes vinculados a la calidad del embrión, como su simetría, forma y diámetro, la forma y tamaño de los blastómeros, el grado de fragmentación, así como el hecho de que su etapa de desarrollo coincida con lo esperado de acuerdo a los días que han transcurrido desde la inseminación (Merton, 2002).

La decisión en cuanto a si un embrión es digno de transferencia, criopreservación e incluso si es elegible para exportación, se basará en la experiencia y conocimientos de la persona que evalúa los embriones con base en lo establecido por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). La evaluación inicia determinando en qué etapa de desarrollo se encuentra el embrión, que puede ser desde un ovocito no fertilizado (Etapa 1) hasta la etapa de un blastocisto eclosionado (Etapa 9), como se describe a continuación (Stringfellow y Seidel, 1998; Bó y Mapletoft, 2013).

**Etapa 1 (Sin fertilizar):** Día 1. Son unicelulares y al realizar una tinción en esta etapa se pueden observar grumos dispersos de la cromatina, lo cual es un indicativo de degeneración.

**Etapa 2 (2-12 células):** Día 2-3. Es un cigoto con al menos 2 blastómeros y hasta más de 8 células.

**Etapa 3 (Mórula temprana):** Día 4-5. Embrión con al menos 16 células. Los blastómeros se encuentran adheridos entre sí y en proceso de compactación y son difíciles de diferenciar uno de otro; la masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

**Etapa 4 (Mórula compacta):** Día 5-6. Embrión con 32 a 64 blastómeros estrechamente unidos, formando una masa amorfa compacta la cual ocupa del 60 al 70% del espacio perivitelino.

**Etapa 5 (Blastocisto temprano):** Día 7. Embrión con 100 a 200 células. Posee en su interior una cavidad llena de líquido llamada blastocele. El embrión ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino. A principios de esta etapa, el embrión puede

parecer de calidad cuestionable ya que en este momento es difícil diferenciar la masa celular interna de las células trofoblásticas.

**Etapa 6 (Blastocisto):** Día 7 a 8. Embrión con 100 a 200 células. Se puede observar una marcada diferenciación del trofoblasto, que forma una membrana adosada a la zona pelúcida. El embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino, la masa celular interna es más oscura y compacta, el blastocele es de gran tamaño. Puede realizarse una diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna en esta etapa de desarrollo.

**Etapa 7 (Blastocisto expandido):** Día 7 a 8. Embrión con más de 200 células, su diámetro aumenta considerablemente y la zona pelúcida se adelgaza aproximadamente un tercio de su grosor original. La presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión. Los embriones recuperados en este estadio se pueden colapsar temporalmente, lo que se caracteriza por una pérdida completa o parcial del blastocele.

**Etapa 8 (Blastocisto eclosionado):** Los embriones recuperados en esta etapa de desarrollo pueden estar en proceso de eclosión o tener completamente desprendida la zona pelúcida. El blastocisto eclosionado puede ser esférico con un blastocele bien definido o colapsado. La identificación del embrión en esta etapa suele ser complicada pero aún puede ser transferido, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos.

**Etapa 9 (Blastocisto eclosionado y expandido):** No son viables para la transferencia.

La evaluación morfológica de los embriones es uno de los pasos más importantes para el éxito de un programa de transferencia de embriones. Los diferentes grados de calidad son determinados por medio de la observación microscópica de la morfología y están basados en la integridad de ésta, los rangos para la

clasificación van del 1 al 4 de acuerdo con la IETS. (Stringfellow y Seidel, 1998; Bó y Mapletoft, 2013).

**Grado 1 (Excelente o Bueno):** Los embriones son simétricos y esféricos con blastómeros uniformes en tamaño, color, y densidad. El grado de desarrollo es coherente lo esperado para el día de recolección. Casi no se observan irregularidades y al menos el 85% del material celular se encuentra intacto. Debe poseer una masa embrionaria viable y no contener fragmentos celulares en el espacio perivitelino; la zona pelúcida debe ser uniforme, sin grietas, no colapsada y sin residuos en su superficie, la cual debe ser convexa para evitar que se adhiera a otras superficies. Los embriones en este grado sobreviven bien a los procedimientos de congelación y descongelación y son recomendados para el comercio internacional.

**Grado 2 (Regular):** Estos embriones tienen moderadas irregularidades en su forma general y en la masa embrionaria, tamaño, color, y densidad de las células. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones a los procedimientos de congelación y descongelación es menor que con los embriones grado 1, pero son viables para ser transferidos en fresco.

**Grado 3 (Pobre):** Estos embriones tienen mayor grado de irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 25% de la masa del embrión debe estar intacta. Estos embriones no sobreviven a los procedimientos de congelación y descongelación, las tasas de preñez son muy bajas cuando se transfieren en fresco.

**Grado 4 (Muerto o Degenerado):** Estos podrían ser óvulos que nunca fueron fecundados o embriones de una célula. No son viables y deben ser descartados.

En los embriones en etapa de Mórula se debe poner especial atención al momento de hacer la evaluación morfológica en el grado de compactación (completa o incompleta), así como en el grado de fragmentación. En la compactación

incompleta algunos blastómeros o partes de ellos se pueden distinguir aún como células individuales, mientras que otras áreas dan la apariencia de una masa amorfa. En una mórula compactada completamente se observa todo el embrión como una masa amorfa y no hay blastómeros visibles.

De igual manera, cuando se evalúa un blastocisto se debe observar cuidadosamente la masa celular interna y el trofoblasto (Racowsky, 2010).

Miller et al. (2003) demostraron que la falta de compactación en mórulas es causada por una disminución en la expresión de genes específicos, lo cual afecta el desarrollo del embrión y coincide con una disminución en la resistencia a la criopreservación.

Un fragmento celular es una pequeña porción anuclear separada de un blastómero. La presencia de grandes cantidades de fragmentos celulares es considerada como indicativo de una mala calidad del embrión (Lindner y Wright, 1983) ya que es una característica de apoptosis, que cuando se produce en exceso (especialmente en la masa celular interna) afecta gravemente el potencial de desarrollo del embrión. Se debe de tener cuidado de no confundir los fragmentos celulares con la masa celular interna real.

La fragmentación se clasifica de la siguiente manera:

0% No hay fragmentos o ampollas presentes.

1-10% del volumen del embrión está conformada por fragmentos celulares.

11-25% del volumen conformado por fragmentos.

25% o más del volumen embrionario está conformado por fragmentos.

Para la evaluación de masa celular interna (ICM) se dan los siguientes grados de calidad:

Buena: ICM de alta calidad con un gran número de células en una sola estructura.

Regular: ICM con un número moderado de células o de organización media, carente de calidad excepcional, pero no excesivamente imperfecta.

Pobre: ICM de calidad inferior, con pocas células o no identificable.

Así mismo para la calidad de trofoblasto se da la siguiente escala de calificación:

Buena: Un trofoblasto de alta calidad con una capa celular continúa y uniforme.

Regular: Trofoblasto con un número moderado de células, con tamaño y forma variable.

Pobre: Trofoblasto de calidad inferior, posee una capa no contigua y con pocas células o con huecos.

Los embriones generalmente se evalúan en la etapa en la que aún están confinados dentro de la zona pelúcida, la cual es una capa extracelular que consta de algunas glicoproteínas altamente modificadas que rodean al embrión de los mamífero entre la etapa de cigoto y blastocisto. El diámetro del embrión oscila entre 150 hasta 190 micras y el espesor de la zona pelúcida va de 12 a 15 micras, permaneciendo así hasta la etapa de blastocisto, cuando debido a la expansión del blastocele se reduce hasta en un tercio de su espesor original, ésta característica es de utilidad en la evaluación (Van Soom et al., 2003).

Otras de las características que deben ser evaluadas tanto en Mórula como en Blastocisto, es la cristalinidad del citoplasma, el cual no debe ser granular o vesicular, los blastómeros deben ser simétricos y de apariencia clara, debe haber una proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino, sin vacuolas (Boiso, 2001).

La expansión del espacio perivitelino puede ser el resultado de la hidratación de la capa gránulo cortical, según lo propuesto por (Dandekar y Talbot, 1992). La reducción en el tamaño del espacio perivitelino es un marcador de menor calidad del embrión.

Al evaluar la morfología, se debe tomar en cuenta lo traslúcido del citoplasma de la especie. Todos los embriones de animales domésticos tienen un gran número de gotas de lípidos en el citoplasma, que dan un tono oscuro al embrión y no permiten la apreciación de ciertas estructuras celulares, como los núcleos y nucléolos. Cuando los embriones bovinos poseen un mayor contenido de lípidos se observa un citoplasma bastante oscuro que afecta la congelación. Por lo tanto, el color del embrión puede ser utilizado como una herramienta para seleccionar embriones de calidad superior (Van Soom et al., 2003).

El Manual de la IETS maneja una evaluación visual de los embriones, por lo que se trata de una evaluación subjetiva de un sistema biológico y no es una ciencia exacta. Por lo tanto, las tasas de preñez pueden ser más bajas de lo esperado debido a otros factores, como las condiciones ambientales, calidad de receptoras, y la capacidad del técnico.

Los embriones clasificados como excelentes o buenos tienen una alta probabilidad de alcanzar la preñez (60-70%) si son transferidos en fresco. No obstante es importante tener en cuenta que existe la posibilidad de que embriones calificados como excelentes luego de una perfecta transferencia no concluyan en una preñez, mientras que embriones de muy baja calidad y transferidos con dificultad, concluyan en preñeces y nacimientos normales (Elsden y Seidel, 1990).

En un artículo de revisión (Betteridge et al., 1989), se evaluaron las tasas de preñez obtenidas en 5 estudios previos de diferentes investigadores, con embriones clasificados morfológicamente en distintas categorías de excelente a pobre como A, B, C, y D, obteniendo como resultado, 67%, 59% , 42% y 26% de preñez respectivamente, demostrando así que la mayor tasa de preñez en transferencia de embriones en fresco, se obtiene con los embriones de mayor calidad. , así mismo, en un informe realizado anteriormente se observó que grupos de embriones con evidencia de degeneración, resultaron en una menor tasa de gestación cuando se compararon con embriones de morfología normal (Shea et al., 1976). A pesar de lo anterior, algunos de los embriones clasificados como

pobres resultaron en gestación y otros con una clasificación excelente no lograron llegar a una preñez. Esto demuestra que la evaluación de la calidad morfológica como único criterio a considerar para determinar la viabilidad de un embrión no es suficientemente precisa. Massip y Leibo (2002), sugieren el uso de otras técnicas no invasivas, como la evaluación de crio-resistencia, el uso de la microscopía especializada o la tinción vital para evaluar el estado de fertilización en la fase de cigoto. Estas técnicas pueden ofrecer información adicional sobre la viabilidad del embrión, aunque podrían emplearse también técnicas invasivas, como el análisis de mRNA de embriones (Yang y Rajamahendran, 2002), o la detección de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL, aunque éstas técnicas pueden comprometer la viabilidad del embrión (Contreras et al., 2008).

### **3.3 Criopreservación**

La criopreservación es una herramienta de suma utilidad que permite conservar embriones de excelente calidad por un periodo prolongado (Córdova et al., 2015) al detener todos los procesos biológicos y mantener la viabilidad y funcionalidad del embrión. A las bajísimas temperaturas que se emplean no hay cambios en el metabolismo o en la estructura de la célula, de tal manera que el embrión puede ser utilizado cuando y donde se den las condiciones favorables para su transferencia y para lograr con éxito la implantación. Sin embargo, la congelación de una célula viva implica un proceso fisicoquímico complejo de transferencia de calor y transporte de agua entre la célula y su medio circundante. Durante la adición y dilución de un crioprotector que penetra a la célula, se generan cambios osmóticos a determinadas velocidades de descenso térmico y a ciertos rangos de temperatura, produciendo alteraciones perjudiciales que comprometen seriamente la vida celular, lo que ha dado lugar a la formulación de protocolos de congelación para la utilización de diferentes crioprotectores con diferentes técnicas de criopreservación. La estandarización de protocolos es de gran importancia ya

que si se realiza el procedimiento de manera inapropiada, la viabilidad de las células puede ser afectada (Palasz y Mapletoft, 1996).

La criopreservación de embriones tiene varias ventajas, como lo son el incremento rápido de un hato con ciertas características genéticas, además de que limita en gran medida la transmisión de enfermedades debido a la presencia de zona pelúcida en buen estado y al correcto lavado del embrión previo a la congelación. Además, con embriones congelados es posible trasladar la línea genética de un animal hacia otro sitio geográfico debido a la comercialización nacional e internacional de embriones congelados. Además es una opción de conservación para especies en peligro de extinción (Cabrera y Fernández, 2006).

Como desventaja de la criopreservación se puede considerar el costo que conlleva todo el procedimiento, así como la necesidad de contar con personal capacitado para realizar correctamente el procedimiento, además de que la tasa de preñez será menor a la transferencia de embriones en fresco (Ariza et al., 2006; Hasler, 2011; Hasler, 2014).

En México no se tienen cifras acerca del uso de ésta técnica reproductiva ya que no ha sido suficientemente difundida, por lo que resulta difícil establecer datos concretos debido a que no se lleva un registro de las transferencias realizadas con embriones criopreservados; Sin embargo, el porcentaje de embriones que son congelados en Estados Unidos después de su obtención ha aumentado de manera constante: en el 2005, el 64% de los embriones recogidos fueron criopreservados (Thibier, 2006), siendo ésta técnica más utilizada para el ganado productor de carne (79%) que para el ganado lechero (59%), manejando el mismo patrón para Canadá con 81% y 65% respectivamente (Hasler, 2014). En general, se considera que en Estados Unidos y Canadá el promedio de embriones obtenidos de una vaca donadora es aproximadamente de 8 a 10, de los cuales 6 a 7 son transferibles, a partir de los cuales se obtienen 3 a 4 gestaciones exitosas con una tasa de preñez de aproximadamente 60% cuando se transfieren embriones frescos (De los Reyes, 1996) y de 40 a 50 % con embriones

criopreservados, aunque en ocasiones puede bajar ésta tasa hasta el 33% de gestación (Fuller, 2004; Mapletoft, 2006; Hasler, 2011; Hasler, 2014).

Los materiales biológicos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde  $-133^{\circ}\text{C}$  (vapores de nitrógeno líquido) a  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido). A estas temperaturas es imposible que se lleve a cabo algún tipo de reacción química o difusión, por lo que se considera que cualquier daño al embrión es causado durante el proceso de congelación/descongelación y no por el tiempo que permanezca criopreservado (Larocca y Fernández Tubino, 1997); debido a esto, se recomienda que los embriones seleccionados para ser criopreservados sean únicamente mórulas o blastocistos de calidad 1 y si al realizar la evaluación post descongelación se establece una clasificación de calidad grado 3 no se recomienda su transferencia, ya que la tasa de preñez será muy baja (Groza et al., 2009). En un estudio realizado (Arrese et al., 1998), se obtuvieron porcentajes de preñez de 57,1% en los embriones de calidad excelente, 52,9% en los de buena calidad y 31,2% en los de calidad regular.

Los embriones sufren un daño morfológico y funcional durante la criopreservación, por tal motivo se ha buscado perfeccionar los protocolos de criopreservación para minimizar dichos daños, los cuales pueden variar dependiendo de factores como el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de la membrana, la especie, el estadio de desarrollo del embrión, así como su origen y calidad (Vajta y Kuwayama, 2006).

### **3.4 Crioprotectores**

Para la criopreservación se utilizan soluciones de protección que contienen agentes crioprotectores, que ayudan a prevenir el daño celular asociado al descenso térmico. En ausencia de sustancias crioprotectoras los embriones mamíferos no sobreviven a un enfriamiento a temperaturas inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Schneiderb y Mazur, 1984).

Las características principales de un agente crioprotector son: estabilizar las membranas celulares, provocar la salida de agua intracelular al mismo tiempo que previene la deshidratación total. Esto evita que se formen cristales de hielo intracelulares que pueden dañar la membrana del espermatozoide y dañar a las proteínas de la célula. Los agentes crioprotectores también reducen la concentración de electrolitos en el medio extracelular y disminuyen el punto eutéctico, que es la temperatura a la cual ocurre la congelación intracelular (Cabodevila y Teruel, 2001). Gracias a esto concentraciones de solutos se elevan a una menor temperatura, de tal forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico será menor (Irene Boiso, 2001).

Los crioprotectores no deben ser tóxicos para los embriones, deben ser altamente solubles en agua y permanecer así a bajas temperaturas. Además deben tener un peso molecular bajo para poder penetrar en las células con facilidad. Sin embargo, cada agente crioprotector difiere con respecto a la velocidad para penetrar los tejidos, el grado de protección que confiere y la toxicidad química que pueden generar sobre las células (Fuller, 2004). El estado de desarrollo embrionario tiene gran influencia sobre la velocidad de penetración del crioprotector. Se ha demostrado que la permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa después de la fecundación, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa. Esto se debe a la diferencia en la relación área/volumen del embrión en los primeros estadios del desarrollo (De los Reyes, 1996), es decir, entre más se desarrolle el embrión tendrá un área mayor para la entrada del crioprotector.

Bioquímicamente es posible distinguir cuatro tipos de crioprotectores: los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), los dioles (etilenglicol), los azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido. Los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular (Irene Boiso, 2001).

### **3.4.1 Crioprotectores Penetrantes**

Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular, protegen al embrión de las lesiones producidas por congelación lenta y reemplazan el agua intracelular, minimizando su cristalización. Los más utilizados son: 1,2-propanodiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG) y glicerol (G). Aunque la célula es permeable a estos agentes, su permeabilidad nunca será de igual magnitud que la del agua (Irene Boiso, 2001).

### **3.4.2 Crioprotectores No Penetrantes**

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas cuando se utilizan ritmos rápidos de congelación. Ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse junto con un agente penetrante. Estos compuestos no penetran a la célula y extraen el agua intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica que provocan entre el interior y el exterior de la célula. Son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas en presencia de poca agua. Los más utilizados son: Sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona (PVP), dextrano y polietilen-glicol (PEG) (Irene Boiso, 2001).

En la congelación se utilizan los agentes crioprotectores a una concentración de aproximadamente 10%, mientras que en la vitrificación se requieren mayores concentraciones de etilenglicol, glicerol o propanodiol, llegando a más del 40%.

Inicialmente el glicerol fue el crioprotector más utilizado en la industria de la transferencia de embriones, sin embargo poco a poco el etilenglicol le ha ganado terreno hasta llegar a ser el crioprotector de elección cuando de embriones se trata.

En el 2007, los miembros certificados de la Asociación Americana de Transferencia de Embriones informaron que, de 330,000 embriones de bovinos obtenidos, 65% fueron congelados después de la recolección. De ellos, el 4% fue

congelado en glicerol, mientras que 96% de los embriones fueron criopreservados con EG para DT (Hasler, 2010). Para 2009, más del 99% de embriones para producción de carne y 94% de los embriones de razas lecheras en Estados Unidos fueron congelados en EG para DT (Hasler, 2014). Esta preponderancia del etilenglicol ha ocurrido a pesar de que en algunos estudios se ha determinado que las tasas de gestación son muy similares cuando se utilizan embriones congelados en glicerol o en etilenglicol (Voelkel y Hu, 1992; Leibo y Mapletoft, 1998).

### **A) Etilenglicol (EG)**

El etilenglicol es un compuesto químico que pertenece al grupo de los dioles por contener dos grupos hidroxilo en su estructura química; es un líquido transparente, ligeramente espeso y de un leve sabor dulce. Cuenta con un alto coeficiente de permeabilidad y por consiguiente, un rápido flujo a través de la membrana plasmática, por lo que al colocar un embrión con EG en un medio isotónico, no habrá una expansión por sobre hidratación como en el caso del Glicerol (Filipiak y Larocca, 2012). Actualmente este crioprotector es el más usado como una alternativa del Glicerol, por considerarlo más práctico. Su principal ventaja consiste en que la transferencia puede hacerse de forma directa sin la eliminación previa del crioprotector, como si se tratara de una inseminación (Larocca y Tubino, 1997).

### **B) Glicerol (G)**

El glicerol es un pequeño soluto poli-hidroxilado con alta solubilidad en agua, y una baja toxicidad cuando las células vivas se exponen a él durante periodos cortos de tiempo. Puede penetrar a través de la membrana plasmática, aunque a un ritmo relativamente lento. Las células pueden tolerar la exposición al glicerol en concentraciones de entre 1 a 5 mol / L, dependiendo del tipo de célula y condiciones de exposición. El glicerol tiene la peculiaridad de incrementar su viscosidad durante el descenso de temperatura, por lo cual es utilizado en el

proceso de criopreservación ultra rápido llamado vitrificación (Fuller, 2004). Este crioprotector fue ampliamente utilizado en los protocolos de criopreservación, sin embargo, para usarlo debe usarse una técnica de congelación y descongelación en pasos, ya que es necesaria su remoción del interior de la célula previo a la transferencia. Por esta razón su uso ha ido disminuyendo por considerarse impráctico, sobre todo a nivel de campo (Larocca y Fernández Tubino, 1997). Sin embargo, ya existe un protocolo en el que puede realizarse este procedimiento en un solo paso utilizando un medio con sacarosa (Filipiak y Larocca, 2012).

### **3.5 Protocolos de criopreservación**

Mientras se evalúan y clasifican los embriones deben de encontrarse en medio PBS, el cual puede estar complementado con 10% de suero fetal bovino, que actúa como una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial, favorece la sedimentación y evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación. Además, el suero fetal bovino incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen el desarrollo del embrión y absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio (De los Reyes, 1996).

Se pueden esperar altas tasas de gestación cuando los embriones son mantenidos a temperatura de laboratorio durante 12 a 18 horas antes de ser transferidos en fresco. En un estudio se evaluaron embriones que fueron congelados hasta tres horas posteriores a la recolección sin encontrar efecto negativo en la tasa de gestación (Hasler, 2001). En cambio, si los embriones se mantienen durante 4 a 6 horas antes de ser criopreservados, al descongelarlos la tasa de sobrevivencia disminuye notablemente (Hasler, 2011).

### 3.5.1 Método convencional

Este método impide la cristalización intracelular mediante un proceso de deshidratación osmótica del embrión durante el enfriamiento lento y controlado. Una vez que el embrión se encuentre parcialmente deshidratado, se sumerge en Nitrógeno líquido para completar la congelación en forma extremadamente rápida.

- **Transferencia Directa de Embriones criopreservados con Etilenglicol**

En 1992 comenzó a propagarse el método de Transferencia Directa (TD) de embriones recién descongelados con un nuevo tratamiento que utiliza etilenglicol (EG) como crioprotector, logrando un efecto rápido y positivo en la industria mundial de la TE, (Hasler, 2014). A continuación se describe tanto la técnica de congelación como la de descongelación y transferencia de embriones criopreservados en etilenglicol.

#### Congelación:

Una vez que se ha evaluado y clasificado el embrión como calidad 1, se coloca en la suspensión de PBS y albúmina sérica bovina y se mantiene una temperatura ambiente de 20 a 22°C, (máximo 25°C). Posteriormente se expone al etilenglicol a una concentración de 1.5 a 1.8 M en una solución de PBS isotónico, dejando pasar aproximadamente de 5 a 10 min para alcanzar un equilibrio osmótico; (Makarevich, 2011). En un estudio en el que se compararon concentraciones de 1,0, 1,5 y 2,0 M de EG, se encontró que una concentración de 1,5 M proporcionó una criopreservación óptima y la mejor supervivencia después de la rehidratación directa (Makarevich et al., 2010). Cuando un embrión está expuesto a un crioprotector permeable, reducirá su tamaño inicialmente por la pérdida de agua, ya que al encontrarse en un medio extracelular que es hiper-osmótico debido a la presencia del criopreservador, el agua del embrión, que compone el 80% de su volumen total, saldrá al medio extracelular mientras el crioprotector penetra al

embrión hasta llegar a un equilibrio osmótico, el cual se completa cuando hay una igualdad osmótica entre el espacio intracelular y el extracelular (Schneiderb y Mazur, 1984). Los embriones de bovino (mórulas tardías y blastocistos tempranos) son más permeables al etilenglicol que al glicerol (Fuller, 2004), por lo que el equilibrio se alcanza más rápidamente al utilizar etilenglicol.

Mientras el tiempo de equilibrio termina, se carga el embrión en pajillas de 0.25 ml, iniciando por una columna de PBS seguida de una burbuja de aire y una columna central de PBS-EG con el embrión, después, otra burbuja de aire y en el extremo una columna de PBS, al final se debe sellar la pajilla (Fig. 1).

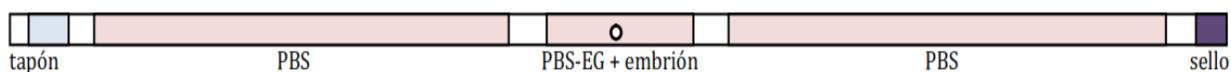


Fig. 1. Disposición de columnas dentro de la pajilla en el método convencional con etilenglicol, (Adaptado de: Filipiak y Larocca, 2012).

Posteriormente se realiza la inducción de la cristalización (seeding) (Fig. 2) a una temperatura de entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-7^{\circ}\text{C}$ , dejando reposar a temperatura estable por 10 minutos para que se lleve a cabo el equilibrio osmótico (Hasler, 2014). La solución PBS con el crioprotector, tiene un punto real de congelación de entre  $-3$  a  $-4^{\circ}\text{C}$ , por lo que debería de cristalizar a esa temperatura. Sin embargo, como se tiene un volumen pequeño (0.25 ml de la pajilla) y una disminución lenta de la temperatura ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), se produce un fenómeno llamado “súper enfriamiento”, en el cual se observa que al llegar a la temperatura de congelación, la solución permanece aún en fase líquida (Mapletoft, 2006). Con la inducción de la cristalización del agua extracelular se forma hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida a medida que el cambio de fase progresa generando un medio hipertónico extracelular, lo que provocará una segunda deshidratación y como la membrana celular es impermeable a los crioprotectores una vez que se llega a los  $0^{\circ}\text{C}$ , queda el embrión únicamente con CP en su interior (Irene Boiso, 2001). Si no se realizara la inducción de la cristalización el medio permanecería líquido y no habría deshidratación. La cristalización espontánea se produce entre  $-15$  y  $-17^{\circ}\text{C}$  y debido a la energía liberada por el

pasaje de una fase líquida a una fase sólida, hay un aumento transitorio de temperatura que tiende a acercarse al punto real de congelación de la solución en cuestión (-3 a -4°C). Como el sistema de refrigeración continúa extrayendo calor y la temperatura continúa descendiendo, la muestra se enfría rápidamente hasta la temperatura anterior. Cómo se llega casi al punto de congelación real no se considera un cambio tan agresivo, por eso la inducción de la cristalización se hace de -5 a -7°C, manteniendo la temperatura constante durante 10 minutos.

Si bien una velocidad de enfriamiento adecuada es necesaria para evitar la congelación intracelular, no garantiza la supervivencia celular (Filipiak y Larocca, 2012). La inducción de la cristalización se realiza al hacer un leve contacto en la superficie de la pajilla con unas pinzas previamente enfriadas en nitrógeno líquido, iniciando en un extremo de la columna de PBS, lo más lejos posible del embrión. Las pinzas son retiradas tan pronto como los primeros cristales sean vistos como un punto blanco en la solución extracelular; la columna de hielo inducida comenzará a avanzar sola por la pajilla, demorando de 4 a 5 minutos en completarse la congelación. También se puede inducir automáticamente en algunos congeladores programables con alcohol metílico, tocando el extremo de las pajuelas con el piso metálico de la cámara, el cual está enfriado en nitrógeno líquido, evitando así un sobre-enfriamiento excesivo de la solución y por lo tanto, se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación de calor debido al cambio de estado. Sin embargo, este procedimiento es menos confiable y más costoso que la inducción mecánica de hielo controlada visualmente (Mapletoft, 2006).

A continuación se realiza el descenso lento y controlado de la temperatura, la cual disminuirá de 0.3 a 0.5°C/min hasta llegar entre -30°C a -35°C (Makarevich, 2011), con lo que se logra una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización intracelular que pueda dañar la membrana celular o los organelos del embrión (Lehn-tensen y Rall, 1983). La velocidad de difusión del agua a temperatura bajo cero es lenta, ya que la velocidad de difusión del agua a través de la membrana es directamente proporcional a la temperatura, se reduce la

temperatura de 0.3 a 0.5°C/min dando el tiempo necesario para que el agua salga del embrión (Mapletoft, 2006).

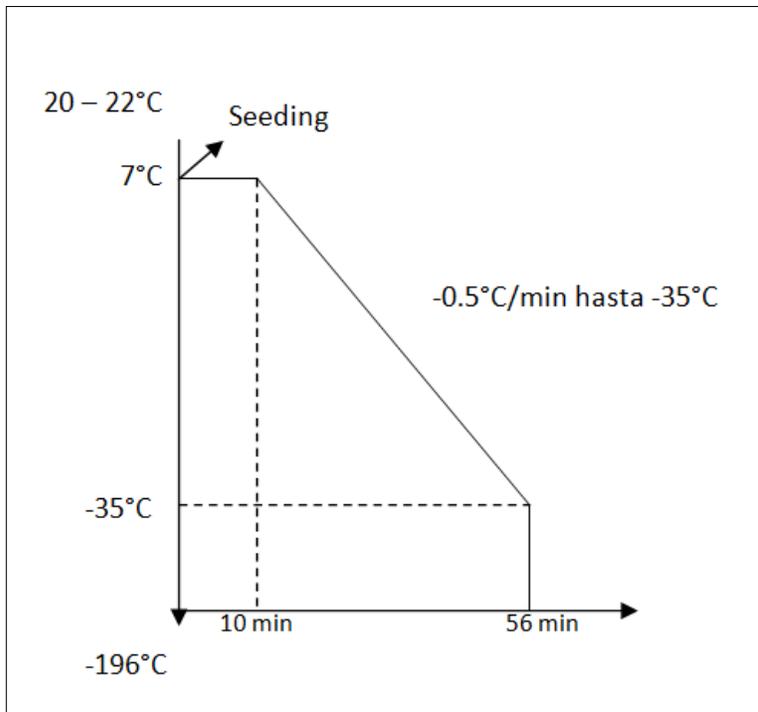


Fig. 2. Curva programada de congelación de embriones (Adaptado de: Filipiak y Larocca, 2012).

Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse lo suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación el agua remanente se congela formando hielo intracelular, lo que causa la destrucción mecánica de las membranas, la formación de burbujas de gas y la destrucción de organelos. Si por el contrario, la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema, pudiendo llegar al colapso celular. Con una velocidad de enfriamiento adecuada la célula se deshidratará antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular con un consecuente daño celular se minimizará. Por tanto, la supervivencia celular a la congelación será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular (Irene Boiso, 2001).

Una lesión celular crio-inducida se puede explicar en función de la formación de hielo intracelular (consecuencia de una velocidad de enfriamiento inadecuada) y en la acción combinada de factores físicos, como el estrés osmótico por el que pasan las membranas celulares durante la congelación y la fuerza física constituida por el hielo formado, el cual ejerce presión sobre las células, resultando en una deformación de las células que a bajas temperaturas puede resultar letal (Schneiderb y Mazur, 1984).

A los  $-35^{\circ}\text{C}$  la deshidratación es del 90%, por lo que al llegar a esta temperatura se coloca la pajilla dentro de un termo con Nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ya que la congelación intracelular será mínima (Hasler, 2014). La congelación de embriones puede ser realizada en diferentes estadios de desarrollo, teniendo cada uno diferentes tasas de sobrevivencia, así como también ventajas y desventajas. La eficiencia de un programa de congelación es evaluada por la observación de la integridad morfológica del embrión en descongelación y su capacidad de implantación (Ávila-Portillo et al., 2006).

### Descongelación:

Se descongela la pajilla a baño maría de  $30$  a  $32^{\circ}\text{C}$  durante  $15$  a  $20$  segundos, lo que resulta en un ritmo de descongelación que va de  $200$  a  $250^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , aunque la tasa de rehidratación depende de la especie del embrión, el estadio de desarrollo embrionario, la relación volumen-área de superficie del embrión, el crioprotector utilizado y la temperatura de exposición (Leibo, 1989).

Se ha mencionado que la disminución del daño a la zona pelúcida se disminuye con una descongelación inicial al aire durante  $10$  a  $15$  segundos antes de sumergirlo. No deben pasar más de  $10$  minutos, máximo  $20$ , desde que se descongela el embrión hasta que es transferido a la hembra receptora, debido a que el etilenglicol es más tóxico que el glicerol (Mapletoft, 2006). Una vez descongelada la pajilla el embrión es transferido directamente al útero de la receptora sin la necesidad de evaluación microscópica y la eliminación del crioprotector, ya que el peso molecular del etilenglicol es tan bajo que puede salir del embrión casi tan rápido como entra el agua para alcanzar el equilibrio

osmótico (Hasler, 2010). La técnica de transferencia directa tiene grandes ventajas sobre todo para su uso práctico en campo (Groza et al., 2009).

- ◆ No se lleva a cabo en pasos.
- ◆ Se puede realizar un mayor número de transferencias por día.
- ◆ No requiere manipulación de los embriones.
- ◆ Uso de equipo mínimo.
- ◆ No se requiere hacer un examen morfológico post descongelación.
- ◆ Facilita el comercio de embriones congelados y su distribución.

- **Transferencia por Pasos de Embriones Criopreservados con Glicerol**

Congelación:

Una vez que se tienen los embriones clasificados como calidad grado 1 y han sido lavados en el medio PBS, se puede adicionar el glicerol a una concentración de 1.36 a 1.5M, dejándolo reposar por 10 minutos, máximo 20 a una temperatura ambiente de 20 a 22°C. Sin embargo, con ésta técnica la deshidratación que se produce puede ser tan grande que disminuya la viabilidad del embrión, por lo que se recomienda más añadir el glicerol en 3 pasos para reducir el estrés osmótico: (Filipiak y Larocca, 2012).

1° PBS – Glicerol a 0.4 M por 5 minutos

2° PBS – Glicerol a 0.8 M por 4 a 10 minutos

3° PBS – Glicerol a 1.36 a 1.5 M por 10 minutos

La desventaja es que se tienen que preparar tres soluciones con diferente concentración de PBS-Glicerol y pipetear el embrión en cada una de ellas, dejándolo el tiempo requerido para que equilibre, procedimiento que se hace laborioso cuando hay que preparar las soluciones y se trabaja con varios embriones (Filipiak y Larocca, 2012).

Una vez alcanzado el equilibrio con la concentración final de glicerol se coloca el embrión dentro de una pajilla de 0.25 ml, la cual tendrá tres columnas de solución PBS-G separadas por burbujas de aire, el embrión se encontrará en la columna central (Fig. 3).

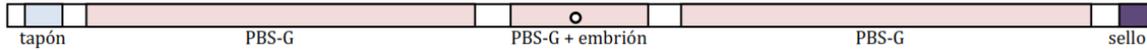


Fig.3. Disposición de columnas dentro de la pajilla con el método en pasos con glicerol, (Adaptado de: Filipiak y Larocca, 2012).

Una vez cargadas las pajillas, se induce la cristalización (seeding) a una temperatura entre  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-7^{\circ}\text{C}$ , manteniendo posteriormente la temperatura estable durante 10 minutos para posteriormente comenzar con el descenso lento de la temperatura, disminuyendo de  $0.3$  a  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta llegar entre  $-30^{\circ}\text{C}$  y  $-35^{\circ}\text{C}$  para pasar la pajilla al termo con nitrógeno líquido (Makarevich, 2011).

Franks et al., (1986) obtuvieron un 85.8% de embriones viables cuando indujeron la cristalización de forma manual y un 46.2% cuando se realizó de forma programada.

### Descongelación:

Se descongelan las pajillas al aire a temperatura de laboratorio (no menos de  $25^{\circ}\text{C}$ ) y se colocan a baño maría a  $35^{\circ}\text{C}$  por 15 a 30 segundos. Al sacar la pajilla, se cortan los extremos y se vierte el contenido en una caja de Petri. Si se coloca el embrión directamente en PBS isotónico, al estar el medio extracelular hipotónico, comienza a entrar agua en el embrión de forma demasiado rápida, haciendo que se hinche al máximo y reviente (Hasler, 2014). Esto ocurre porque el agua se mueve a través de las membranas celulares del mamífero más rápido de lo que lo hacen todos los crioprotectores permeables, por lo tanto el agua entra a la célula más rápido de lo que el crioprotector puede salir (Leibo, 1984). Esto se evita lavando al embrión en pasajes sucesivos con concentraciones decrecientes de PBS-Glicerol, para controlar la entrada de agua:(Filipiak y Larocca, 2012).

1: 0.5 M de PBS-G por 6 min

2: 0.3 M de PBS-G por 6 min

3: PBS más 10% de SFb

también puede utilizarse sucrosa a una concentración de 0.3M en una dilución de tres pasos de 5 minutos cada uno (Mapletoff, 2006):

1: 0,75 M (6%) de glicerol y 0,3 M de sacarosa

2: 0,375 M (3%) de glicerol y 0,3 M de sacarosa

3: 0,3 M de sacarosa, sin glicerol.

Otra forma de descongelado con la que se evitan los tres pasos, es colocando al embrión en una solución de PBS-sucrosa a una concentración de 0.5 a 1.0 M por 10 a 15 minutos (Mapletoff, 2006).

En un estudio se demostró que la dilución de 1.5 M de glicerol con menos de 0.5 M de sacarosa puede permitir la sobre hidratación del embrión en el medio isotónico (Suzuki, et al., 1990). La sucrosa es un agente crioprotector de alto peso molecular que no penetra la membrana celular, quedándose en el medio extracelular, convirtiéndolo en hipertónico, por lo que el glicerol comenzará a salir del embrión, así como la poca agua que hayan quedado en su interior para mantener el equilibrio osmótico (Leibo, 1984). Posteriormente se puede pasar a un medio PBS suplementado con 15% de suero, para rehidratarlo antes de la transferencia o se puede transferir directamente y dejar que se rehidrate en el medio isotónico del útero. Si los embriones no son inmediatamente transferidos a las receptoras, deben ser cultivados in vitro a 37 ° C para apoyar el mecanismo de reparación endógena (Schneiderb y Mazur, 1984). La ventaja del método en pasos es que al extraer el embrión de la pajilla se puede realizar su evaluación con la ayuda del microscopio para valorar su viabilidad y tener mayor certeza de que se transfiere un embrión con buena posibilidad de gestación (Filipiak y Larocca, 2012).

- **Método de Leibo o en un paso**

En 1984 (Leibo, 1984) desarrolló el método One-Step en el cual la extracción del crioprotector (Glicerol 1,5 M) se efectúa dentro de la misma pajilla donde se congela el embrión, evitando así, la manipulación en el laboratorio.

Se carga la pajilla con una gran columna de PBS-sacarosa 1.08M, seguida de una pequeña burbuja de aire y luego otra columna con PBS-Glicerol conteniendo el embrión, otra burbuja de aire y una pequeña columna de PBS-Glicerol 1.5M (Schneiderb y Mazur, 1984) (Fig. 4).

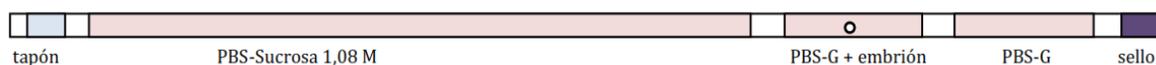


Fig. 4. Disposición de columnas dentro de la pajilla en el método de Leibo, (Adaptado de: Filipiak y Larocca, 2012).

Una vez que la pajilla esté descongelada, se realiza la extracción del glicerol dentro de la misma pajilla mezclando las columnas mediante un golpecito con 2 dedos en las burbujas de aire y colocándola vertical con el tapón hacia abajo para que el embrión descienda. De ésta manera, arriba queda el glicerol y abajo la sacarosa, la cual está en contacto con el embrión, el cual pierde el glicerol que tiene en su interior, encogiéndose en respuesta a la dilución hipertónica del medio extracelular. Se deben dejar pasar 20 minutos a una temperatura ambiente de 20-37°C para que se termine el proceso. La rehidratación se efectúa directamente en el útero de la receptora, el cual es un medio isotónico en el que el embrión recuperará su volumen normal (Mapletoft, 2006).

Éste método tiene la desventaja de disminuir los porcentajes de gestación a un 30%, mientras que con el sistema tradicional se obtiene de 45 a 50%. Esto se asocia a la dificultad de mezclar ambas soluciones crioprotectoras dentro de la pajuela (Cabrera y Fernández, 2006). Cuando el glicerol es extraído, la viabilidad embrionaria puede ser afectada al no lograr una mezcla homogénea de las distintas soluciones (Cabodevila y Teruel, 2001), lo que se suma a una pérdida ocasional del embrión porque éste se puede adherir al algodón que la pajuela

tiene en uno de sus extremos. Además, se ha demostrado que las altas concentraciones de sacarosa causan daño al embrión cuando existen elevadas temperaturas (Palasz y Mapletoft, 1996).

Una variante a este sistema fue la desarrollada por Massip y Van der Zwalmen (Massip y Van der Zwalmen, 1984), quienes obtuvieron buenos resultados cuando los embriones fueron equilibrados y congelados en una mezcla de glicerol 1.36 M + sacarosa 0.25 M en medio PBS, una vez descongelados fueron transferidos directamente a las hembras receptoras sin necesidad de remover los crioprotectores. En un estudio, 476 embriones fueron congelados/ descongelados y procesados en sacarosa antes de la transferencia sin evaluación microscópica, resultando en 42.4% de preñez (Mapletoft, 2006).

### **3.5.2 Criopreservación no equilibrada**

Este término se usa para referirse a la criopreservación por medio de procedimientos en los cuales las células y tejidos no están en equilibrio con las altas concentraciones de crioprotectores (más del 40% ó 6 a 8 M), las cuales causan una acelerada deshidratación de las células y el enfriamiento ocurre antes del equilibrio osmótico entre el medio y el embrión (Vajta y Kuwayama, 2006). Al lograr una mayor deshidratación se genera una mayor penetración de los crioprotectores antes del enfriamiento logrado en un solo paso a más de 500°C/min (Leibo y Songsasen, 2002; Shaw y Jones, 2003). Los procedimientos no equilibrados de criopreservación poseen dos variantes: la criopreservación rápida y la vitrificación, dependiendo si se forma o no hielo en la solución durante la criopreservación (Shaw et al., 2000).

- **Método de Criopreservación rápida**

Este método es usado para describir la criopreservación de células que han sido parcialmente deshidratadas antes de ser sometidas a una tasa de enfriamiento rápido de 1,250°C/min. Para esta técnica es indispensable el uso de una mezcla de 2 a 4.5 M de crioprotectores permeables (glicerol, propanediol, dimetilsulfóxido o etilenglicol), y 0.25 a 0.5 M de crioprotectores no permeables tales como la sacarosa, trehalosa, lactosa o galactosa), (Gordon, 2003). Después de un período de equilibrio (30 segundos a 3 minutos), los embriones en un estado parcialmente deshidratado son enfriados a -21°C durante 35 minutos antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido (Cabodevila y Teruel, 2001). En contraste con la vitrificación, el agua extracelular se congela y la osmolaridad de la solución de congelación aumenta, causando mayor pérdida de agua desde las blastómeras del embrión. La criopreservación de embriones bovinos por esta técnica ha proporcionado tasas de supervivencia bajas (33,3%), si se compara con los métodos convencionales de congelación lenta o de vitrificación (Palasz y Mapletoft, 1996).

- **Método de Vitrificación**

Es un método de criopreservación ultra rápido, en el cual, los embriones se encuentran en una solución PBS enriquecida con BSA y altas concentraciones de crioprotectores (mayor a 40% o 5 a 7 M), los cuales alcanzan una alta viscosidad, solidificándose durante el enfriamiento sin que lleguen a formarse cristales de hielo (Vajta y Kuwayama, 2006). En condiciones prácticas, esto se logra mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido, representando una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2500°C/min, demorándose así pocos segundos en congelarse. La solución no se cristaliza, se vitrifica, es decir, aumenta abruptamente su viscosidad y se transforma a un estado sólido no estructurado similar al vidrio. De esta manera, mantiene la misma distribución iónica y molecular que en estado líquido (Shaw et al., 2000). Para regresar a los embriones hasta temperaturas fisiológicas se debe de realizar un calentamiento

con altas tasas de ascenso térmico (2.500°C/minuto), para lo que se introduce la pajuela en un baño maría a 20°C (Saito et al., 1994) o a temperaturas comprendidas entre 30 y 39°C durante pocos segundos (Leoni et al., 2012). Una vez calentadas las pajuelas, los crioprotectores penetrantes deben ser retirados de los embriones para su rehidratación en solución a concentración suficiente para alcanzar una osmolaridad ligeramente inferior a la de la solución de vitrificación. Este medio puede o no estar contenido en la misma pajuela (Filipiak y Larocca, 2012).

### **3.6 Alteraciones morfológicas y metabólicas causadas por la criopreservación**

Ningún protocolo de congelación o vitrificación garantiza la total integridad del material criopreservado, ya que estos procedimientos representan un desafío para las estructuras biológicas, causando estragos a nivel estructural, ultra-estructural o metabólico, determinando en muchos casos la muerte celular (Boiso, 2001; Cabodevila y Teruel, 2001; Cabrera y Fernández, 2006).

#### **Alteraciones morfológicas**

La mayoría de las lesiones celulares morfológicas crio inducidas se deben a la formación de hielo intracelular y al estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación. En diversos estudios se ha demostrado que la criopreservación está asociada con alteraciones en la zona pelúcida, ya que durante la congelación convencional más de 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si el ascenso y/o descenso térmico no son realizados adecuadamente, siendo más frecuentes los daños durante la descongelación (Hyttel et al., 1986). Otros daños morfológicos que se pueden encontrar después del proceso de congelación/descongelación son un menor recuento de células totales, la presencia de restos celulares en el espacio

perivitelino, los defectos a nivel citoplasmático que dan un aspecto de espacios vacíos e irregularidades en el ordenamiento espacial de las células embrionarias debido a la deshidratación, la cual permite reacciones intermoleculares como uniones entre grupos sulfidrilos libres de tipo irreversible (Kasail et al., 1990).

En un estudio (Fair et al., 2001) en el cual se evaluaron blastocistos post descongelación, se observó un agrandamiento del espacio perivitelino, la disminución del tamaño celular, además de daños en las microvellosidades de las células trofoectodérmicas y presencia de gotas lipídicas y detritus celulares que probablemente sean restos de células que colapsaron durante los procesos de criopreservación. Con una alta concentración de crioprotectores intracelulares las células embrionarias incorporan agua y aumenten excesivamente su volumen, pudiendo dañar estructuras internas o bien desintegrarse por completo (Kaidi et al., 2000), Se ha señalado que la criopreservación mediante vitrificación genera daños sobre las membranas celulares, las cuales pierden la capacidad para llevar a cabo la mayoría de sus funciones (Ohboshi et al., 1998).

Aunque los crioprotectores son necesarios para minimizar los daños que puedan ocurrir durante la criopreservación, estos compuestos pueden también tener efectos nocivos sobre los embriones debido a su toxicidad química. En muchos casos el crioprotector produce una alteración en la organización de los filamentos que componen el citoesqueleto, lo cual conlleva a una despolimerización de los mismos (Dobrinsky, 1996). Otras alteraciones asociadas con la adición de sustancias crioprotectoras son el aumento de tamaño mitocondrial, presencia de vacuolas y aparición de signos de degeneración nuclear (Fair et al., 2001).

### **Alteraciones metabólicas**

La disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua puede provocar modificaciones en la composición del medio intracitoplásmico (Karow, 2001), de tal forma que los solutos altamente concentrados podrían precipitar o afectar la conformación proteica y consecuentemente su función metabólica.

Se ha observado un efecto de la congelación que consiste en la disminución en el consumo y utilización de los nutrientes, principalmente en los embriones de inferior calidad, reduciendo en un 50% la producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa debido a una disminución en la expresión del transportador de glucosa transmembranal GLUT 1 (Khurana y Niemann, 2000).

Otro cambio metabólico asociado con la criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro lo constituye la disminución en la síntesis de ADN, independientemente del crioprotector utilizado (Takagi et al., 1996). Estos cambios probablemente se relacionen con alteraciones ultraestructurales que modifican las vías fisiológicas del metabolismo y reducen el consumo de nutrientes.

Durante la congelación, los embriones rara vez entran en contacto directo con los cristales de hielo, permaneciendo en la fracción no congelada, donde son expuestos a diversos tipos de estrés físico, tales como: daño mecánico derivado de la formación de burbujas debido a un aumento de gas soluble; alteración en los procesos de difusión y osmosis producto de un aumento de la viscosidad, y desnaturalización proteica debido a cambios de pH, (Morris, 2000).

Además, el glicerol podría inhibir el sistema Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPasa, el cual es fundamental para el mantenimiento del gradiente osmótico celular (Barnet, 1987).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Es importante analizar y determinar si el tipo de crioprotector utilizado en el congelamiento de embriones puede afectar su viabilidad para ser transferidos, después de haber sido criopreservados por periodos prolongados. Aunque se ha evaluado comparativamente la viabilidad de embriones bovinos criopreservados en etilenglicol y glicerol, el periodo transcurrido entre la congelación y la descongelación en los estudios publicados no supera un año (Larocca, et al., 1997), de aquí la importancia de aprovechar embriones congelados desde hace 10 años en dos tipos de crioprotectores para evaluar el efecto a largo plazo de dichos agentes al mismo tiempo que se satisface la necesidad del CEIEPAA de aumentar el hato lechero e incluir genotipos de alto mérito para la producción sin introducir animales o embriones provenientes de otros sitios.

## **5. HIPÓTESIS**

La viabilidad y calidad post descongelación de embriones bovinos mantenidos en criopreservación por largos periodos, no se verá afectada por el tipo de crioprotector utilizado durante su congelación.

## **6. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Realizar una evaluación morfológica al descongelado de embriones que fueron criopreservados por 10 años en glicerol o etilenglicol, para comparar su viabilidad y establecer si hay diferencia entre crioprotectores.

### **Objetivos particulares**

- Determinar el grado de degeneración celular de embriones que se han mantenido congelados con dos diferentes criopreservadores durante más de 10 años y clasificarlos de acuerdo con la IETS, después de ser descongelados.
- Realizar un análisis comparativo para determinar si existe diferencia entre la clasificación embrionaria pre y post congelación entre el uso de glicerol o etilenglicol.
- Registrar la tasa de fertilidad obtenida a partir de los embriones que habían sido criopreservados en cada agente.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Localización

Ésta investigación se realizó en el módulo de Bovinos Productores de Carne del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIPAA), que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicado en Tequisquiapan, Querétaro con las coordenadas 21° 07' de latitud norte y 99° 22' de latitud oeste.

### 7.2 Embriones

Se dispuso de 30 embriones bovinos de raza Holstein Neozelandés, recolectados y criopreservados en un termo con Nitrógeno líquido desde el año 2004, en los que se usó glicerol o etilenglicol como crioprotector. Antes de su congelación los embriones fueron evaluados y clasificados como embriones de calidad 1 en etapas de desarrollo 4, 5 ó 6, con base a los parámetros de calidad y desarrollo embrionario establecidos por la IETS (Stringfellow y Seidel, 1998), procediéndose a congelar los siguientes embriones:

<b>CRIOPROTECTOR</b>	<b>ETAPA DE DESARROLLO</b>
Etilenglicol	19 Mórulas y 3 Blastocistos
Glicerol	8 Mórulas

Para el proceso de congelación/descongelación en etilenglicol, se utilizó en este estudio la técnica de Transferencia Directa de embriones por método convencional y para glicerol, la técnica de Transferencia por Pasos para congelación y la Técnica de Un Paso en solución PBS-sucrosa para descongelación, ambos descritos en la sección 3.5.1.

### 7.3 Selección y sincronización de vacas receptoras

Se seleccionaron 20 vacas de raza Limousin con una condición corporal entre 5 y 7 (con base en una escala del 1 al 9). (Eversole et al., 2009). Todas las vacas estaban clínicamente sanas, sin alteraciones reproductivas y fueron confirmadas como vacías y ciclando a través de ultrasonografía y se incluyeron hembras con más de 2 meses de haber parido y novillas con un peso promedio de 400kg. Para la sincronización de las receptoras se utilizó el siguiente protocolo:

Días del Protocolo	Tratamiento
Día 0	Aplicación de un Dispositivo intravaginal con Progesterona 10% (CIDRs® 1.9 g) e inyección de 1.5 ml (0.0063 mg) del análogo sintético del factor liberador de gonadotropinas GnRH (Conceptal®) (IM)
Día 7	Retiro de dispositivo intravaginal y administración de 2 ml (530 mcg) del análogo de PGF2 $\alpha$ (Lutalyse®)(IM)
Día 9	Administración de 1.5 ml (0.0063 mg) de (Conceptal®) (IM)
Día 9 – 12	Detección de celos por observación directa durante todo el día y la noche.
Día 16– 17	Palpación rectal y <b>TE</b> a las vacas que resultaron positivas a presencia de cuerpo lúteo de acuerdo al criterio del médico evaluador, transfiriendo 6 el día 16 y 4 el día 17.

CUADRO 1.- (Bisinotto et al., 2014), **GnRH**: Factor Liberador de Gonadotropinas, **PG-F2 $\alpha$** : Postaglandina-F2alfa, **IM**: Intramuscular, **TE**: Transferencia de Embriones.

Únicamente las vacas que respondieron al tratamiento de sincronización y presentaron un cuerpo lúteo de clasificación 2 ó 3 al ser palpadas fueron candidatas para la TE; por lo tanto sólo se descongelaron tantos embriones como receptoras disponibles hubieron, siempre y cuando fueran considerados viables para su transferencia.

## **7.4 Descongelación de embriones**

Como primer paso se confirmó que se contará con todo el material requerido y que el inventario escrito de embriones concordará con los existentes en el termo con Nitrógeno.

Una vez confirmado lo anterior se pudo dar inicio sacando la primer pajilla del termo, subiendo la canastilla para poder separarla con facilidad al utilizar las pinzas especiales para este fin, teniendo cuidado de no subir la canastilla a menos de 5 cm por debajo del borde del termo, ya que si sobresale se corre el riesgo de dañar los embriones por el choque térmico.

### **7.4.1 Descongelación de embriones criopreservados con Glicerol 10%**

Una vez que se tuvo la pajilla con el embrión criopreservado en Glicerol fuera del termo con Nitrógeno, se mantuvo en el aire por 15 s, posteriormente se sumergió en un termo descongelador con agua a 35°C durante 15 segundos; antes de terminar éste proceso se tenía preparada una caja de Petri con una gota de aproximadamente 1 ml del medio de descongelación VIGRO One-Step Thaw Plus® (Bioniche Animal Health INC., USA) que es una solución Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DBPS) con 1.0M de sucrosa para descongelar en un paso. Una vez que la pajilla se retiró del termo se cortaron ambos extremos y se desechó la primera parte de PBS y únicamente la porción que contiene el embrión se depositó en la gota del medio para descongelar, permitiendo la rehidratación de este por un lapso no mayor a 10 minutos, tiempo en el cual se localizará al embrión dentro del medio con un microscopio estereoscópico para evaluar sus características, (Leibo, 1989; Mapletoft, 2006; Hasler, 2014).

#### **7.4.2 Descongelación de embriones criopreservados con Etilenglicol**

Una vez que se tuvo la pajilla con el embrión criopreservado en Etilenglicol fuera del termo se dejó a temperatura ambiente durante 15 segundos para posteriormente sumergirla en agua a una temperatura de 32°C por 15 s, mientras transcurrió este tiempo se colocó en una caja de Petri, una gota (1 ml) de VIGRO Holding Plus® (Bioniche Animal Health INC., USA), el cual es una complejo a base de una solución Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DBPS) para mantener a los embriones a una temperatura ambiente de 18 a 25°C por un periodo de tiempo aproximado de 9 horas. Al sacar la pajilla del agua y cortar sus extremos se vertió todo el contenido dentro de la gota del medio para ubicar al embrión para su evaluación, (1989).

#### **7.5 Evaluación de embriones descongelados**

Los embriones descongelados se evaluaron con base a los criterios de la IETS, y se consideró para su transferencia únicamente aquellos que se calificaron como calidad 1 y 2, los cuales después de su evaluación se colocaron en 1 ml de VIGRO Holding Plus® dentro de uno de los pozos de la caja multi-pozos para observarlo en el microscopio compuesto, adaptado con una cámara fotográfica de alta calidad (Olympus E-330 de 7.5 mega pixeles) para capturar imágenes y crear un registro fotográfico de los embriones a distintas magnificaciones (4x, 10x y 40x).

#### **7.6 Transferencia de embriones**

Una vez capturadas las imágenes, se cargaron los embriones con medio Holding en pajillas de 0.25 ml para ser transferidos en un periodo no mayor a 2 h.

(45)

Las vacas receptoras fueron dietadas 12 h antes de la transferencia. Para recibir al embrión se realizó un bloqueo epidural con 6 – 8 ml de lidocaína al 2%, se lavó y secó la región posterior del animal, haciendo énfasis en la zona perianal y labios vulvares. Con ayuda de otra persona se abrió la vulva para introducir el aplicador en la vagina en un ángulo de 45°. Al localizar la entrada al cérvix se rompió la camisa sanitaria y se pasó el aplicador a través del cérvix para llegar al cuerpo del útero y depositar el embrión en la porción anterior del cuerno ipsilateral al ovario que presentó cuerpo lúteo.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Respuesta de hembras receptoras a la sincronización.

De acuerdo con el protocolo de sincronización (Sección 7.3) el día 16 del calendario se evaluaron las 20 vacas receptoras para determinar su etapa del ciclo estral, así como la presencia de un *CL*. De esta forma se decidió si se incluirían o no en la programación de transferencia de embriones, descartándose a la mitad por no presentar un *CL* de las características requeridas para la transferencia.

### 8.2 Evaluación de embriones

Al contar con 10 receptoras se dividieron en dos grupos de 5, quedando de la siguiente manera:

	<b>GRUPO 1 (G1)</b>	<b>GRUPO 2 (G2)</b>
<b>CRIOPROTECTOR UTILIZADO</b>	Glicerol	Etilenglicol
<b>ETAPA DE EMBRIÓN TRANSFERIDO</b>	Etapa 4 (Mórula compacta)	Etapa 4 (Mórula compacta)
<b>MADRE DONADORA</b>	38264	38264
<b>PADRE</b>	880	865
<b>NO. DE HEMBRAS RECEPTORAS</b>	5	5
<b>NO. DE EMBRIONES DESCONGELADOS</b>	5	6

CUADRO 2.- Características de ambos grupos de hembras receptoras de embriones.

Posterior a la descongelación, se evaluaron 5 embriones en glicerol y 6 embriones en etilenglicol ya que uno de ellos no cumplía con los parámetros establecidos para su transferencia.

De acuerdo al protocolo de trabajo la decisión de transferir o no se tomó con base a una evaluación visual por observación a través del microscopio estereoscópico por el mismo técnico que los evaluó cuando fueron congelados,

analizando únicamente su viabilidad y se documentaron todos los embriones por medio de imágenes fotográficas, las cuales fueron de utilidad para hacer una evaluación más detenida y objetiva de los embriones descongelados mediante el análisis de las imágenes. Al realizar la evaluación de las fotografías se confirmó la clasificación otorgada a los embriones y se pudo comparar la integridad morfológica entre los que se criopreservaron con glicerol en comparación con los de etilenglicol, teniendo los siguientes resultados:

	<b>GLICEROL</b>	<b>ETILENGLICOL</b>
<b>% DE VIABILIDAD POST-DESCONGELADO</b>	100%	83%
<b>CALIDAD 1</b>	100%	67%
<b>CALIDAD 2</b>	0%	17%
<b>DEGENERADOS</b>	0%	17%

CUADRO 3.- Resultados obtenidos de la comparación de embriones criopreservados con glicerol y etilenglicol post-descongelación.

Se consideraron viables todos los embriones que cumplieron con los criterios requeridos y necesarios para aumentar la probabilidad de lograr una gestación exitosa, considerando:

- Simetría
- Apariencia esférica
- 85% de material celular intacto para calidad 1
- 50% para calidad 2
- Mínimas irregularidades en la forma general
- Compactación celular completa
- 25% o menos de fragmentos celulares dispersos en espacio perivitelino
- Zona pelúcida lisa sin grietas
- Citoplasma cristalino sin presencia granular ni vesículas.

A continuación se presentan imágenes de los embriones descongelados criopreservados con glicerol y transferidos.

(48)



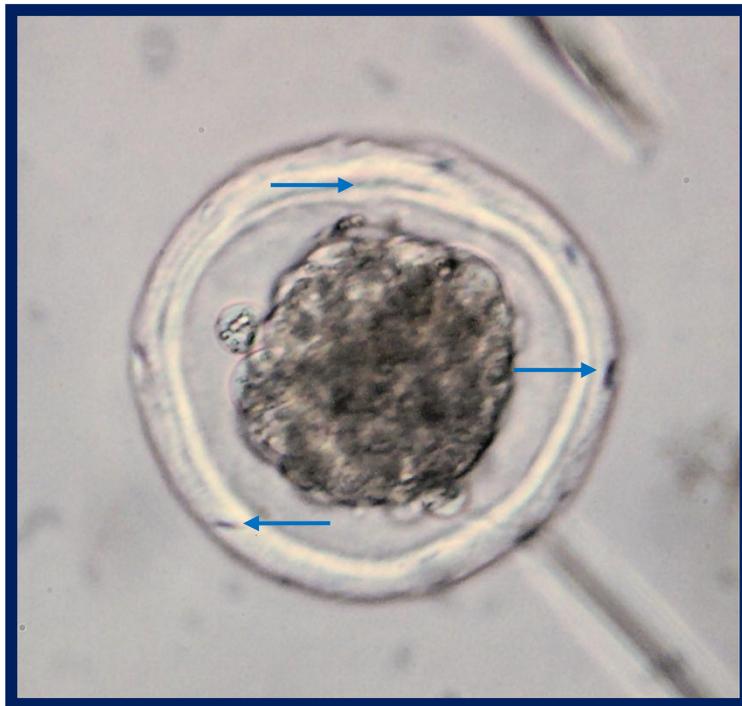
**FIG. 1.-Embrión 1-G;** se muestra arriba el primer embrión descongelado en glicerol, en el cual se puede apreciar una excelente simetría y una perfecta forma esférica.



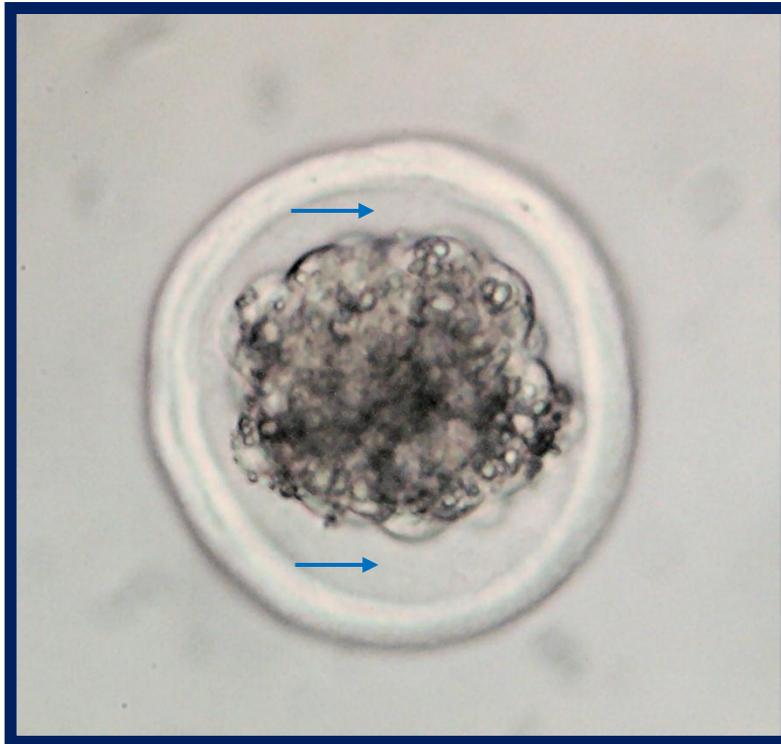
**FIG. 2.-Embrión 2-G;** segundo embrión descongelado con glicerol, se observa una zona pelúcida lisa y en perfecto estado, sin grietas ni rupturas.



**FIG. 3.- Embrión 3-G**, tercer embrión descongelado en glicerol, se observa una completa integridad del material celular y una compactación completa correspondiente al estadio 4.



**FIG. 4.- Embrión 4-G**, cuarto embrión descongelado en glicerol, se observan aparentes anomalías en la zona pelúcida, las cuales corresponden a artefactos que pueden causar una falsa impresión de daño.



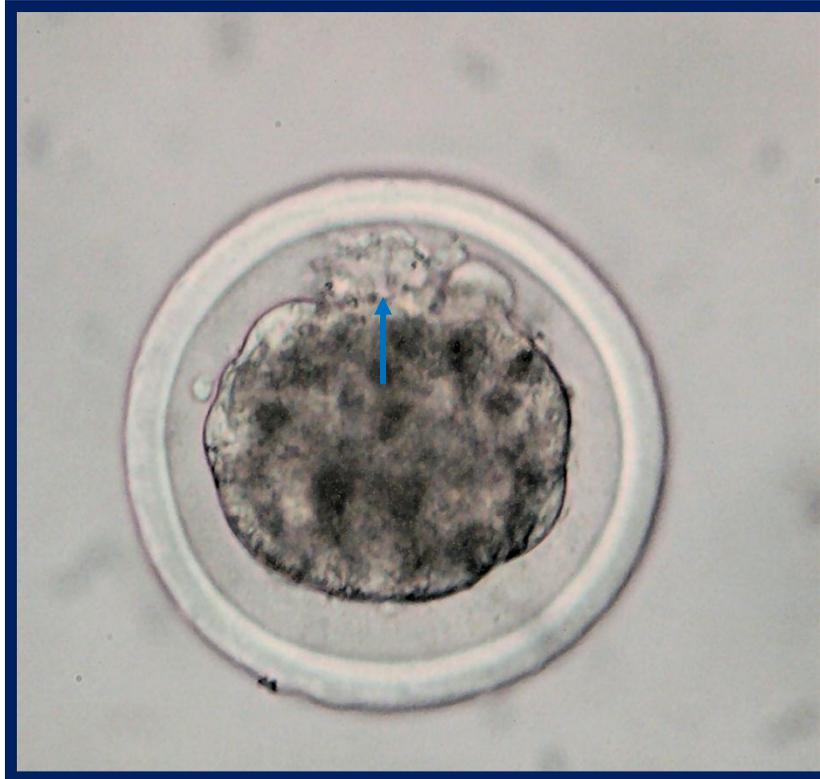
**FIG. 5.- Embrión 5-G**, último embrión descongelado en glicerol, se puede apreciar un espacio perivitelino limpio, libre de fragmentos celulares.

Embriones descongelados criopreservados con etilenglicol y transferidos.

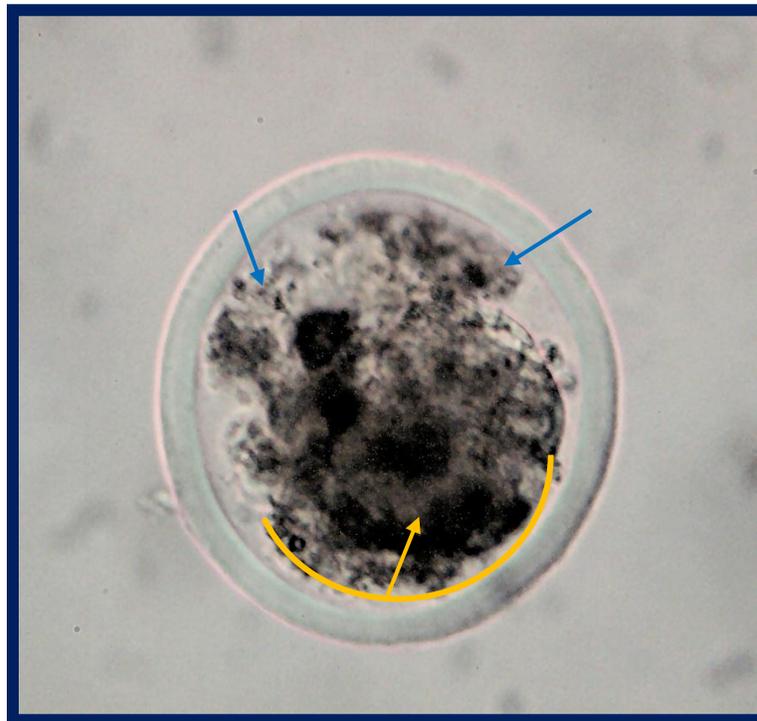


**FIG. 6.- Embrión 1-Et**, primer embrión con etilenglicol descongelado de excelente calidad, esférico, espacio perivitelino cristalino, masa celular compacta, sin anomalías aparentes.

(51)

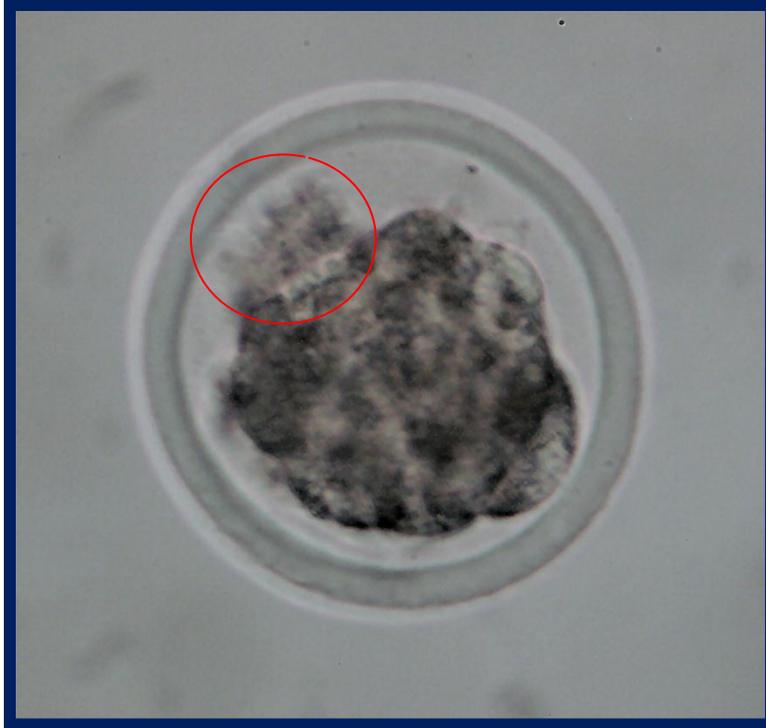


**FIG. 7.- Embrión 2-Et**, segundo embrión en etilenglicol descongelado, se puede observar marcado con una flecha roja como la masa celular comienza a fragmentarse, sin embargo involucra una proporción menor al 15% de los blastómeros = calidad 1 (Bueno).

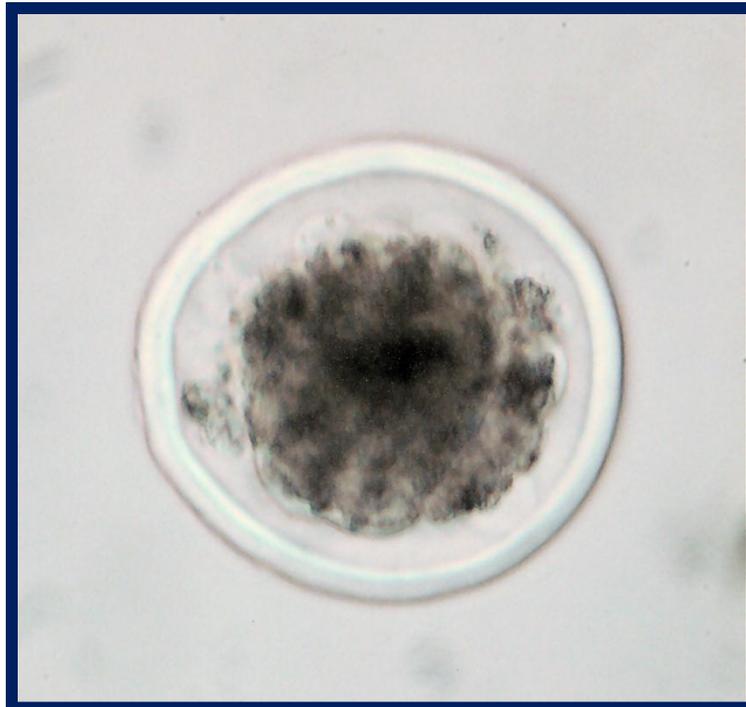


**FIG. 8.- Embrión 3-Et**, tercer embrión en etilenglicol descongelado, presenta irregularidades y fragmentación celular, sin embargo el 50% del material celular se encuentra intacto por lo tanto se considera calidad 2.

(52)



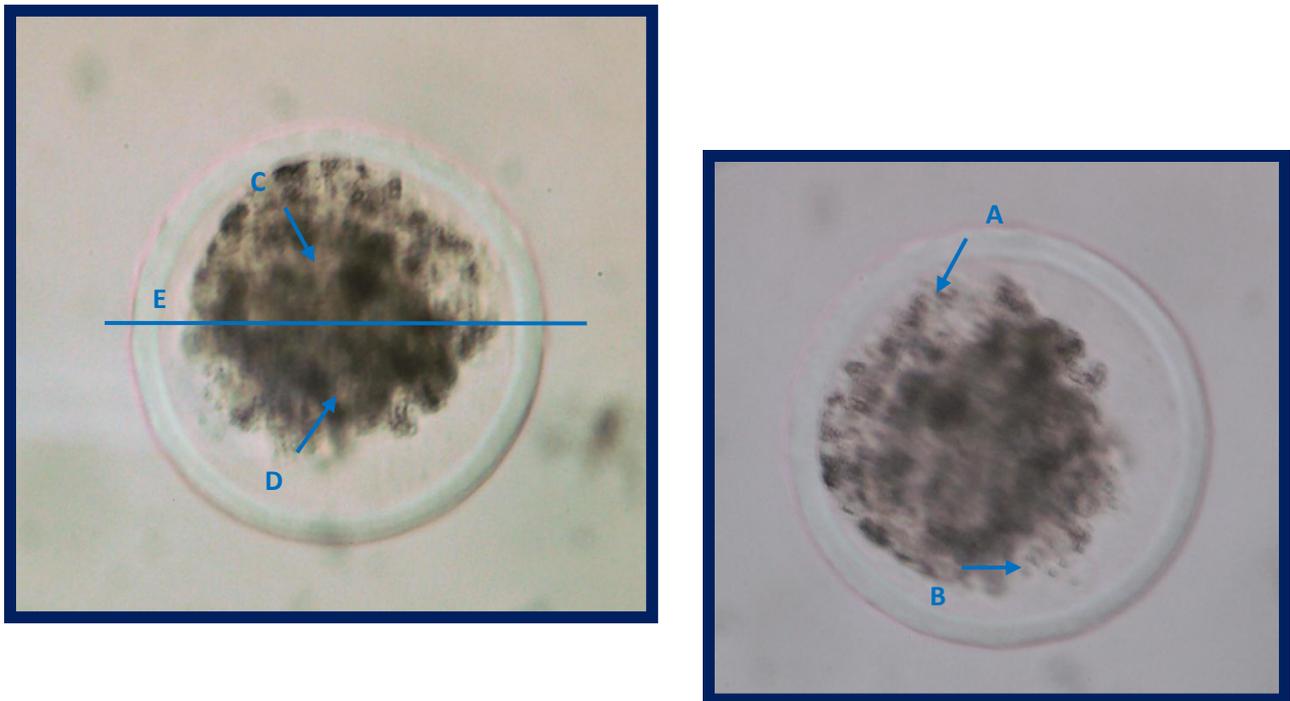
**FIG. 9.- Embrión 4-Et**, cuarto embrión en etilenglicol descongelado, excelente calidad con presencia de artefacto que pudiera confundirse con daño en la masa celular.



**FIG. 10.- Embrión 5-Et**, quinto embrión en etilenglicol descongelado y viable, la imagen se encuentra fuera de foco pero se aprecia la buena calidad en la integridad del embrión.

Un solo embrión criopreservado con etilenglicol como crioprotector fue clasificado como de mala calidad, por lo cual no fue aprobado para ser transferido.

En la evidencia fotográfica se puede apreciar un aplastamiento celular con una compactación incompleta, observándose espacios entre los blastómeros, los cuales se encuentran dispersos ocupando más del 70% del espacio perivitelino acompañado de fragmentos celulares, por lo que la masa celular no se considera viable y por lo mismo, no se recomienda la transferencia de dicho embrión, ya que las posibilidades de lograr una gestación es casi nula.



**FIG. 11.- Embrión 0-Et, No transferible por degeneración. A y B:** Presencia de detritos celulares causados por una posible apoptosis. **C y D:** Se observan espacios entre blastómeros por compactación incompleta. **E:** Se marca un eje a la mitad de la célula para evidenciar el porcentaje de superficie que ocupa la masa celular dispersa.

### **8.3 Diagnósticos de gestación**

Se realizó por medio de ultrasonografía a los 68 días post transferencia, tiempo en el cual los embriones tenían un desarrollo de 75 días, diagnosticándose como gestación positiva el 40% de las hembras con embrión en glicerol y el 0% de las hembras con embrión en etilenglicol.

### **8.4 Crías logradas**

Las dos hembras diagnosticadas como preñadas lograron llevar a término su gestación, pariendo un macho cada una, los cuales se pusieron a disposición del rancho para su uso más conveniente y aunque no fueron incluidos en el hato lechero se registró este hecho como una referencia para futuras transferencias y mejor aprovechamiento de los embriones con los que aún se cuenta en el ceiepaa.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

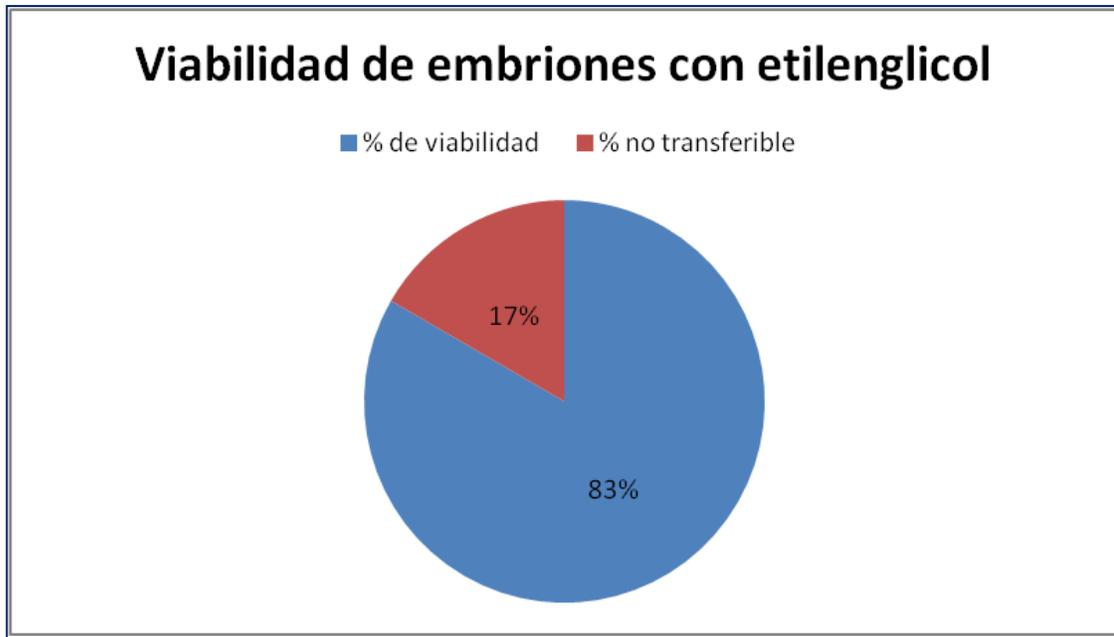
Debido a que el número de observaciones fue muy pequeño, no se pudo llevar a cabo un análisis estadístico. Se tenía contemplado utilizar la prueba de chi cuadrada o análisis de varianza al comparar las 2 poblaciones en cuestión, pero por lo ya mencionado sólo se analizaron usando estadística descriptiva.

En este estudio se consideró a cada uno de los embriones evaluados como la unidad experimental y a los crioprotectores (Glicerol y Etilenglicol) como las variables independientes (2 poblaciones), siendo los rangos de calificación de calidad (parámetros del 1 al 4) la variable dependiente.



Gráfica 1. En los resultados con Glicerol se obtuvo el 100% de viabilidad, de los cuales todos permanecieron en el mismo grado de calidad que tenían antes de la criopreservación.

No. de embrión descongelado	Calidad		ni	Observación
	Pre-congelado	Post-descongelado		
1	1	1	20%	Viable
2	1	1	20%	Viable
3	1	1	20%	Viable
4	1	1	20%	Viable
5	1	1	20%	Viable
Total			100%	



Gráfica 2. En los resultados con Etilenglicol se obtuvo el 83% de embriones viables para ser transferidos, de los cuales el 67% fue calidad 1 y el 17% calidad 2.

Únicamente un 17% fue considerado como no transferible.

Tabla 2. Resultados Etilenglicol

No. de embrión descongelado	Calidad		ni	Observación
	Pre-congelado	Post-descongelado		
1	1	1	16.67	Viable
2	1	1	16.67	Viable
3	1	2	16.67	Viable
4	1	1	16.67	Viable
5	1	4	16.67	No transferible
6	1	1	16.67	Viable
Total			100%	

## 10. DISCUSIÓN

La transferencia de embriones ha sido una herramienta reproductiva muy útil en diferentes áreas científicas, sin embargo, al comparar la utilización de embriones en fresco con los transferidos posterior a una criopreservación se puede apreciar que aunque la técnica en fresco tiene algunas ventajas sobre los criopreservados como lo es la tasa de preñez (frescos: 60%, criopreservados 40 a50%), costos más reducidos y una capacitación menos estricta del personal, la criopreservación de embriones tiene muchas otras ventajas (Fuller, 2004; Mapletoft, 2006; Hasler, 2014). Esta técnica comenzó a desarrollarse en el área pecuaria para obtener embriones de excelente calidad genética y ser utilizados en el momento de mayor conveniencia. Además la comercialización nacional e internacional de embriones ha sido otra forma de obtener ingresos para hacer rentable ésta práctica en los establos (Cabrera y Fernández, 2006).

Por otra parte, se ha confirmado por varios estudios que la congelación es eficaz para la inactivación de muchos virus, como el IBR, que se pueden adherir a la superficie de la membrana pelúcida, por lo que ésta técnica puede ser utilizada también para control de enfermedades (Palma, 2001). La criopreservación de embriones también ha sido una gran opción para preservar los recursos genéticos de animales, principalmente los que están sufriendo una dilución genética y los que se encuentran en peligro de extinción, ya que ésta técnica puede permitir que una línea o raza se reconstituya en una sola generación (Segura y Montes, 2001).

En el ámbito de la reproducción asistida en humanos también se ha recurrido a éste método cuando se obtienen más de un embrión de excelente calidad y se desea conservarlos en caso de que el primer intento de embarazo fracase o por si la mujer desea en un futuro un segundo embarazo. Actualmente se ha legalizado la adopción prenatal de embriones y la maternidad subrogada, aunque también se ha recurrido a esta técnica para generar una banca de embriones como material biológico para la investigación o experimentación. Sin embargo, cuando se trata de criopreservar embriones humanos existe un mundo de opiniones cuestionando

la ética y moral de quienes lo defienden y lo practican (Santamaría, 2000; Chi et al., 2002; Corral E, 2009).

En este trabajo enfocado al área pecuaria se realizó una evaluación de embriones estadio 4 (mórula compacta) posterior a la descongelación tras 10 años de criopreservación, sin encontrarse alteraciones morfológicas de gran magnitud, tal como ha sido informado previamente (Racowsky, 2010). Se analizó el grado de compactación, que debe ser completa, sin dejar ver trofoblastos sueltos o fragmentos en el espacio perivitelino que pudieran sugerir apoptosis, también se hizo una evaluación de simetría, forma y tamaño (Merton, 2002), encontrándose que el 81% de los embriones entraron en categoría calidad 1 post-descongelación.

En este trabajo el reducido tamaño de la muestra no permitió hacer una comparación estadística de la viabilidad morfológica entre embriones criopreservados con glicerol y etilenglicol al comparar la clasificación de calidad pre y post congelación (Bó y Mapletoft, 2013). Sin embargo, llama la atención que todos los embriones que permanecieron en glicerol como crioprotector tuvieron la misma clasificación post-descongelación que la que habían obtenido antes de ser congelados, por lo que en esos embriones se obtuvo el 100% de viabilidad morfológica y Calidad 1, además de que con ellos se obtuvo un 40% de preñez. . En cambio, de los embriones conservados con etilenglicol uno no era viable después de la descongelación, obteniéndose un 83% de viabilidad morfológica y solo un 66% de Calidad 1, además de que se logró y 0% de preñez. Lo anterior podría sugerir una mejor protección a largo plazo por parte del glicerol, no obstante, la muestra es demasiado pequeña como para poder arrojar una conclusión en este sentido.

Los resultados aquí obtenidos concuerdan con el estudio realizado por (Márquez, 2005), quien analizó embriones criopreservados desde 1988, otros desde 1999 y otros entre el 2000 y 2002, los cuales fueron descongelados y observados por medio de la técnica de TUNEL para identificar fragmentos de ADN celular y relacionar el tiempo de criopreservación con el grado de apoptosis, obteniéndose

una correlación altamente significativa entre ambas variables, por lo que se pudo afirmar que a menor tiempo de criopreservación menor es el grado de apoptosis celular. Sin embargo en una evaluación por observación con microscopio estereoscópico no se puede llegar a apreciar éste suceso a menos que sea un daño altamente considerable. Por lo tanto, podemos observar embriones aparentemente viables morfológicamente sin percatarnos del daño celular interno, lo que podría explicar una baja en la tasa de preñez, aunado a otras diferentes variables.

Anteriormente se han realizado investigaciones para determinar la viabilidad de embriones criopreservados, tomando como referencia la capacidad de éstos para producir una gestación, tal es el caso Hasler, (2011) y Ariza et al., (2006), quienes tuvieron mejores resultados con glicerol (37% vs 34% y 22% vs 14% respectivamente). Sin embargo, Wei-Xin (2011) tuvo mejores resultados con etilenglicol. Por su parte, Rodríguez et al., (2007) después de un análisis estadístico no encontraron una diferencia significativa entre ambos crioprotectores, obteniendo un 50% de preñez tanto para glicerol como para etilenglicol. Resultados similares fueron encontrados por otros autores (Voelkely y Hu, 1992; Leibo y Mapletoft, 1998; Dochi et al., 1995). La diferencia entre todos los estudios mencionados y el presente estudio es que en todos ellos el lapso de criopreservación fue de meses o pocos años y aunque el tiempo que pueden permanecer viables los embriones criopreservados aún es incierto, hay algunos autores como (Gordon, 1994) o (Leibo y Songsasen, 2002) que sugieren como factible la idea de mantener viables embriones a  $-196^{\circ}\text{C}$  en Nitrógeno líquido durante 1,000 años o más. No obstante, para que esto ocurriera habría que asegurar un correcto almacenamiento de los embriones a lo largo de los años, así como la correcta aplicación de los protocolos de congelación/descongelación. Larocca y Fernández Tubino, (1997) afirman que el daño al embrión es causado durante éstos procesos y no por el tiempo que permanezca criopreservado; esto podría explicar los buenos resultados obtenidos en la viabilidad morfológica después de 10 años de permanecer congelados en glicerol. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, utilizando una técnica más sofisticada para la

evaluación de los embriones (técnica de túnel), Márquez (2005) sí encontró una asociación entre el tiempo en que los embriones permanecen en criopreservación y el grado de fragmentación de su ADN.

No obstante, la evaluación de la calidad morfológica como único criterio a considerar para determinar si un embrión es capaz de lograr una gestación, no es suficiente (Massip y Leibo, 2002), así que existe la posibilidad de que después de una buena transferencia de un embrión calidad excelente, no se produzca una preñez. La tasa de gestación es un efecto multifactorial y ninguno de los parámetros que intervienen en la transferencia es completamente responsable del éxito (Rodríguez et al., 2007), por lo tanto, el haber obtenido un 20% de gestación total nos indica que con el uso de este tipo de biotecnologías se pueden tener resultados adversos independientemente de si se siguió un protocolo al pie de la letra. Entre los factores que influyen en el éxito de este tipo de trabajos se encuentran los protocolos de congelación/descongelación, algún defecto morfológico en el embrión no perceptible en la evaluación por microscopio estereoscópico, factores externos como la edad de las vacas ya que algunas eran novillas de apenas 370kg; la condición corporal de algunas hembras que se encontraban en 5 puntos de 9; la época del año, tomando en cuenta que fueron meses de mucho frío llegando hasta  $-3^{\circ}\text{C}$  por las noches; tamaño del cuerpo lúteo (CL), ya que algunas presentaron un CL muy pequeño apenas perceptible o quizá la habilidad del médico que llevó a cabo la transferencia.

## 11. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se probó que la utilización de embriones descongelados a pesar de llevar almacenados un periodo de 10 años en nitrógeno líquido, en su mayoría presentaron una buena clasificación que los consideró viables desde el punto de vista morfológico, sin encontrar diferencia significativa entre Glicerol y Etilenglicol, sin embargo no todos lograron llegar a una gestación. Esto pudiera asociarse a diferentes causas ya que el éxito de esta práctica no depende de alguna en específico, sino que todas pueden llegar a afectar los resultados, siendo los factores relacionados con las hembras receptoras uno de ellos y quizá el más importante, aunque también alguna anomalía morfológica en el embrión imposible de detectar con una simple evaluación por microscopio pudiera afectar la tasa de preñez, sin descartar los factores externos como las condiciones ambientales o la capacitación del personal para supervisar y llevar a cabo todo el procedimiento.

Por todo lo anterior, se recomienda realizar un minucioso plan de trabajo tratando de controlar la mayor parte de los factores externos que pudieran afectar el objetivo buscado, así como contar con un número considerable de hembras receptoras para poder descongelar la mayor cantidad posible de embriones y de esta forma realizar un análisis estadístico y determinar si existe o no diferencia entre la clasificación de calidad pre y post congelación, así como entre crioprotectores. De igual manera y en la medida de lo posible, se recomienda realizar una evaluación complementaria para detectar daño interno en el embrión a través de técnicas preferentemente no invasivas como tinción *in vivo* para no comprometer la viabilidad del embrión, aunque también pudieran utilizarse técnicas invasivas como la de TUNEL para determinar grado de apoptosis.

## 12.REFERENCIAS

Alarcón VB, Marikawa Y. Spatial alignment of the mouse blastocyst axis across the first cleavage plane is caused by mechanical constraint rather than developmental bias among blastomeres. *Molecular Reproduction and Development* 2008; (75):1143–1153.

Ariza LE, Camacho W, Serrano-Novoa CA. Evaluación retrospectiva de la tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en diferentes cruces bovinos en el municipio de Puerto Araujo, Santander y Colombia. *Revista electrónica de veterinaria* 2006 Abril; 7(4):1-7.

Arreseigor CJ, Sisul A, Arreseigor AE, Stahringer RC. Effect of cryoprotectant, thawing method, embryo grade and breed on pregnancy rates of cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology* 1998; (49):160.

Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, *et al.* Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Ginecología y Obstetricia* 2006; 57(4):291-300.

Barnet RE, The effect of dimethylsulfoxide and glycerol on Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase y la estructura de la membrana. *Cryobiology* 1978; (15):227-229.

Barros CM, Barcelos ACZ, Gouvea LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN, Trinca LA. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reproduction, Fertility and Development* 2008; (20):152.

Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JN, Gimenes LU, Filho MF, Martins CM, Rodrigues CA, Bó GA. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 2011; (76):1583- 1593.

Betteridge KJ, King WA, Rieger D. Bovine embryo development from conception to collection. In: *Proceedings of the 8th annual Convention. American embryo transfer Association*, 1989:83-97.

Bisinotto RS, Ribeiro ES, Santos JEP. Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows. *Animal* 2014:1-9.

Bó GA, Peres LC, Cutaia LE, Pincinato D, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reproduction, Fertility and Development* 2012; (24):272-277.

Bó GA, Mapletoft JR. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction* 2013 Septiembre; 10(3):344-348.

Bó G.A, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 2014; (81):38-48.

Boiso I. Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de fertilidad* 2001 Agosto; 18(4):20-22.

Cabodevila J, Teruel M. Criopreservación de embriones bovinos. En: Palma GA (ed) *Biología de la Reproducción*. 1st ed. Argentina: ReproBiotec, 2001.

Cabrera P, Fernández A. Criopreservación de embriones: una herramienta básica en la reproducción asistida. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 2006 Julio; 47(2):258-6576.

Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Bó GA. Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* 2000; (53):495.

Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, Joo JY, Chang SS, Chung KS. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Human Reproduction* 2002; 7(8): 2146-2151.

Cocero MJ. Moreno DE, Agular B. Ultrastructural Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Ovine Embryos Using Two Cryoprotectants. *Biology of Reproduction* 2002; (66):1244-1258.

Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 2009; (72):262-270.

Contreras DA, Galina CS, Ávila JG, Asprón MP, Moreno-Mendoza N. A system to evaluate the quality of frozen embryos through short-term culture. *Animal Reproduction Science* 2008 July; 106(3-4):369-79.

Córdova A, Guerra JE, Villa A, Olivares J, Cansino G, Juárez ML, et al. Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2015; 9(2):22-40.

Corral E. La desprotección jurídica del embrión humano tras la nueva ley de reproducción humana asistida y la ley de investigación biomédica 2009; 20(69):183-200.

De los Reyes SM. Las biotecnologías en la reproducción animal. *Avances en producción animal* 1996; 21(1-2): 3-11.

Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryo. *Theriogenology* 1996; (45):17-26.

Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda H, *et al.* Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 1998;(49):1051-1058.

Elsden RP, Nelson LD, Seidel Jr GE. Superovulating cow with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin. *Theriogenology* 1978; (9):17-26.

Elsden RP, Seidel GE Jr. Procedures for recovery bisection, freezing and transfer of bovine embryos. 1<sup>st</sup> ed. USA: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1990.

Eversole DE, Browne MF, Hall JB, Dietz RE. Body condition scoring beef cows. *VirginiaTech* 2009; 400-791.

Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward EA. Ultrastructural of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocysts production. *Molecular Reproduction and Development* 2001; (58):186-195.

Filipiak Y, Larocca C. *Biología en Reproducción Bovina*. 1st ed. Uruguay: Facultad de Veterinaria - Universidad de la República; 2012.

Franks GC, Coley SL, Betterbed B, Page RD. The effect of freezer type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology* 1986 June 26; 26(2):135-144.

Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters* 2004; 25(6):375-388.

García D. Adopción de embriones humanos en la ley de reproducción asistida Española. *Dereito* 2008; 17(2):49-63.

Gasque R. *Enciclopedia Bovina*. 1<sup>st</sup> ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2008.

González A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Canadian Veterinary Journal* 1994; (35):158-162.

Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. 2<sup>nd</sup> ed. Dublin, Irish Republic: Department of Animal Science and Production, University College Dublin; 2003.

Greve T, Callesen H, Hyttell P. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nordisk Veterinaer Medicin* 1983; (35):408-421.

Groza I, Cenariu M, Bartos A, Bogdan L, Ciupe S, Morar I, *et al.* Application of several cryopreservation methods and morphological evaluation of bovine embryos after thawing. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara* 2009; XLII (2):164-169.

Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH. Effects of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 1987; (27):139-168.

Hasler, J. F.. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science* 1998; 76(3):52-74.

Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001; (56):1401-1415.

Hasler JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 2010; (22): 119–125.

Hasler JF. Bovine embryo transfer: are efficiencies improving?. *Reproduction, Fertility and Development* 2011:1-18.

Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 2014; (81):152-169.

Hyttel P, Lehn-Jensen H, Greve T. Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by two-step freezing method. *Acta Anatomica* 1986; (125):27-31.

Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990 May; 89(1):91-7.

Kaidi SE, Donnay I, Dessy E, Massip A. Effect of freezing or vitrification on the quality of in vitro produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 2000; (53):257.

Karow AM, *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists.* *Criobiology* 2001:1-38.

Khurana NK, Niemann H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. *Theriogenology* 2000; (54):313-326.

Larocca CE, Fernández Tubino A. Congelación de embriones bovinos con etilenglicol vs glicerol. Archivos de Zootecnia 1997; (46):295-300.

Lamb C. Factors affecting pregnancy rates in an IVF embryo transfer program. Joint Proceedings of the AETA and the CETA 2005:31-36.

Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology 1984 March 15; 21(5):767-790.

Leibo SP. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryo. Theriogenology 1989; (31):85-93.

Leibo SP, Mapletoft RJ. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. In: Proceedings of the 17th Annual Convention of AETA, San Antonio, TX: AETA, 1998:91-98.

Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non domestic species. Theriogenology 2002;(57):303-326.

Lehn-tensen H, Rall WE. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. Theriogenology 1983; (19):263-277.

Leoni G, Bogliolo L, Berlinguer E, Rosati L, Pintus PP, Ledda S, et al. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. Cryobiology 2012; (45):204-2012.

Lindner GM, Wright Jr. RW. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 1983 August 17; 20(4):407-416.

Looney CR, Boutte BW, Archbald LF, Godke RA. Comparison of once daily and twice daily FSH injection for superovulating beef cattle. Theriogenology 1981; (15):13-22.

Makarevich AV, Kubovicová E, Hegedusová Z, Pivko J, Louda F. Post-thaw culture in presence of insulin-like growth factor I improves the quality of cattle cryopreserved embryos. Zygote 2011; 20(2):97-102.

Mapletoft RJ, Bennett-Steward K, Adams GP. Recent advances in the superovulation of cattle. Reproduction Nutrition Development 2002; (42):601-611.

Mapletoft RJ. Bovine embryo transfer. IVIS Reviews in veterinary medicine 2006 November 17; (1):1-21.

Mapletoft RJ, Bo GA and Adams GP. Superovulation in the cow: Effects of gonadotrophins and follicular wave status. Journal of Reproduction and Development 2007; (52):7-18.

Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. *Animal Reproduction* 2009; 6(1):114-124.

Márquez YC, López-Ortega A, Galina C. Relación entre el tiempo de criopreservación y el grado de apoptosis en embriones bovinos. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* 2005; 11(1):13-18.

Massip A, Van Der Zwalm P. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Veterinary Record* 1984, (115):327-328.

Massip A, Leibo S. Factors influencing cryopreservation of domestic animal embryos. . In: Van Soom A, Boerjan ML (eds) *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-invasive Techniques*. 1<sup>st</sup> ed. The Netherlands: Kluwer's Academic Publishers, 2002.

Macmillan KL, Thatcher WW. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biology of Reproduction* 1991; (45):883-889.

Merton S, Morphological evaluation of embryos in domestic species. In: Van Soom A, Boerjan ML (eds) *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-invasive Techniques*. 1<sup>st</sup> ed. The Netherlands: Kluwer's Academic Publishers, 2002.

Miller DJ, Eckert JJ, Lazzari G, Duranthon-Richoux V, Sreenan J, Morris D, *et al.* Tight junction messenger RNA expression levels in bovine embryos are dependent upon the ability to compact and in vitro culture methods. *Biology of Reproduction* 2003; (68):1394-1402.

Monniaux D, Chupin D, Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 1983; (19):55-81.

Morris J, *Asymptote* cool guide of cryopreservation. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, England: Asymptote Ltd; 2007.

Nasser L F, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, *et al.* Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nellore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011; (76):320-327.

Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomangane H. Ultrastructure of bovine in vitro-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. *Zygote* 1998; (6):17-26.

Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 1996; (14):127-149.

Palma GA, Burry E, Nigro M, Ezcurra D, Guller Frers L, Witt A, et al. Tasas de preñez después de la tranferencia de embriones bovinos congelados con etilenglicol o glicerol: factores que las afectan. Cuartas Jornadas Nacionales CABIA y Primeras del MERCOSUR 1998:207-213.

Prathers RS, Barnes L, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction* 1987; (37):859-866.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $2\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 1995; (44):915-923.

Racowsky C, Vernon M, Mayer J, Ball GD, Behr B, Pomeroy KO, et al. Standardization of grading embryo morphology. *Fertil Steril* 2010 August; 94(3):1152-3.

Rodríguez J, Giraldo C, Castañeda S, Ruiz T, Olivera M. Análisis multifactorial de las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 2007; 12(2):978-984.

Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1994; (41):1053-1060.

Santamaría L. Técnicas de reproducción asistida. *Aspectos Bioéticos* 2000; (1):37-47.

Segura JC, Montes RC. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Revista Biomédica* 2001; (12):196-206.

Seidel GE, Seidel SM. Training manual for embryo transfer in cattle. 2nd ed. CO, USA: FAO; 2005.

Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984 January; 21(1):68-79.

Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; (53):59–72.

Shaw JM, Jones GM. Terminology associate with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update* 2003; 9(6):583-605.

Shea BF, Hines DJ, Lightfoot DE, Ollis GW, Olson SM. The transfer of bovine embryos. *Commission of the European Communities* 1976:145-152.

Shea BF, Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* 1981 January; 15(1):31-42.

Stringfellow DA, Seidel SM. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS): a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. 3rd ed. Champaign, IL: Savory, Ill.: IETS; 1998.

Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, Matsuoka M, Nishikata Y, *et al.* Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon invitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology* 1990 October 19; 34(6):1051-1057.

Takagi M, Sakonju L, Suzuki T. Effect of cryopreservation on the synthesis of DNA by the inner cell mass of in vitro produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 1996; (45):164.

Talbot P, Dandekar P. Perivitelline Space: Does It Play a Role in Blocking Polyspermy in Mammals?. *Microscopy Research and Technique* 2003; (61):349–357.

Thibier, M. Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species. *NewsLetter* 2006;(24):12-18.

Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006 January 7; 65(1):236-44.

Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, de Kruif A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reproductive BioMedicine Online* 2003 July 29; 7(6):664-670.

Voelkel SA, Hu YX. Use of ethyleneglycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 1992 October 21; (37):687-697.

Wei-Xin LIU, Hua LU, Meng-Jun LUO, Liang-Zhi XU. Effects of different cryoprotectants and cryopreservation protocols on the development of 2-4 cell mouse embryos. *CryoLetters* 2011; 32(3):240-247.

Walsh JH, Mantovani R, Duby RT, Overstrom EW, Dobrinsky JR, Enright WJ, *et al.* The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology* 1993; (40):313-321.

Yang MY, Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science* 2002; (70):159–169.