



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL

EFEECTO DE LA VITRIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE  
FERTILIDAD DE EMBRIONES CAPRINOS ALMACENADOS EN  
PAJILLAS DE 0.25 ml Y TUBOS CAPILARES

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

NIDIA JUDITH GALLEGOS JUÁREZ

TUTOR:

DR. JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. JOEL HERNÁNDEZ CERÓN

DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

A Dios, por la fortaleza, sabiduría, paciencia, fuerza y entereza para concluir satisfactoriamente este sueño que emprendí hace dos años. Porque me permitió conocerle, me dio libertad y por darme una vida FELIZ.

A mis padres, Alberto y María Guadalupe, porque no recuerdo un instante en mi vida en el que no haya sentido su apoyo y amor incondicional. En especial, a mi papá que me abrió las puertas de su vida y de su corazón.

A mis hermanos, Jorge y Oscar, quienes han sido compañeros de vida, siempre incondicionales.

A mis sobrinos, Erika Daniela, Carlos Alberto y Fernando Sadat, por llenar mi vida de alegría e inocencia y por ser el motor que me impulsa a salir adelante.

A mis amigos, Alicia, Chabela, Miguel, Ricardo, Vianey, que han estado conmigo a cada paso que doy brindándome su apoyo y amistad incondicional. Por ser mis hermanos.

A Javier, por su cariño y apoyo, sin él nada hubiera sido posible.

¡LOS AMO!

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por darme cabida en sus aulas como parte suya y por la oportunidad de lograr este grado académico.

Al CONACyT, por la beca otorgada que me permitió seguir adelante con mi formación como investigadora.

A mi tutor, Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez, por depositar en mi su confianza, compartir sus conocimientos y dirigirme con paciencia.

Al Comité Tutoral, por todas las observaciones hechas en el diseño, redacción y revisión del proyecto.

A los miembros del jurado, por sus aportaciones hechas con el fin de mejorar el presente trabajo.

A las personas que colaboraron en la ejecución de la fase experimental.

A todos

GRACIAS

Sólo hay un bien: el conocimiento.  
Sólo hay un mal: la ignorancia.  
Sócrates (470 AC-399 AC) *Filósofo griego.*

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la viabilidad, evaluada a través de la calidad morfológica a la desvitrificación y la sobrevivencia a la transferencia, de blastocistos caprinos vitrificados usando pajillas de plástico (0.25 ml) o tubos capilares de vidrio (5  $\mu$ l) como envases. Cincuenta y siete blastocistos (calidad 1 y 2) fueron asignados aleatoriamente a dos grupos; el grupo 1, 28 embriones (calidad 1) fueron vitrificados en pajillas de plástico, mientras que en el grupo 2, 27 embriones (calidad 1) y 2 (calidad 2) fueron vitrificados en tubos capilares de vidrio. Los embriones fueron expuestos a 200  $\mu$ l de medio 1 compuesto por 12.5% dimetilsulfoxido (DMSO) + 12.5% etilenglicol (EG) + 75% PBS, durante 3 minutos. Los embriones fueron después expuestos al medio 2 compuesto por 25% DMSO + 25% EG + 50% PBS + 1.0 M sacarosa, durante 30 segundos. Los embriones fueron cargados individualmente en 2  $\mu$ l de medio 2, almacenados individualmente, sumergidos directamente en nitrógeno líquido y almacenados por al menos cuatro meses. Para la desvitrificación, las pajillas y los capilares se sacaron del termo y se expusieron 8 segundos al aire a temperatura ambiente. Para descargar el embrión, cada envase fue sumergido en una alícuota con 0.5 ml de medio de desvitrificación 1 compuesto por 0.25 M sacarosa + 4 ml PBS, durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo, los embriones fueron rehidratados en solución PBS + 0.15 M sacarosa durante 1 minuto (medio de desvitrificación 2). Después, el embrión fue puesto en PBS y fue morfológicamente evaluado usando un microscopio estereoscópico. A la desvitrificación 19 embriones del grupo 1 (68%) permanecieron en calidad 1, mientras que 9 embriones (32%) cambiaron a calidad 2; en el grupo 2, 23 embriones (79%) permanecieron en calidad 1 y 6 embriones (21%) cambiaron a calidad 2. No hubo efecto del envase sobre el cambio en la calidad ( $P > 0.05$ ). Después de su desvitrificación, se transfirió un solo embrión a cada receptora mediante laparoscopia. La tasa de gestación obtenida fue de 37% (21/57), sin diferencias entre embriones vitrificados en pajillas y tubos capilares (32% vs 41%;  $P > 0.05$ ). La técnica de vitrificación de blastocistos de cabra descrita en este trabajo, es eficiente, de bajo costo y fácil de aplicar bajo condiciones de

campo y no se observaron diferencias en la tasa de gestación cuando los embriones fueron vitrificados en pajillas de plástico o tubos capilares.

Palabras clave: Criopreservación, Vitrificación, Embriones, Caprinos, Pajilla de plástico, Tubo capilar.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the viability, assessed by the morphological quality at warming and survival after transfer, of vitrified goat blastocysts using plastic straws (0.25ml) or glass capillary tubes (5 µl diameter). Fifty-seven blastocysts (grade 1 and 2) were randomly assigned to two groups: in group 1, 28 embryos (grade 1) were vitrified in plastic straws whereas in group 2, 27 embryos (grade 1) and 2 (grade 2) were vitrified in capillary glass tubes. Embryos were exposed to 200µl of equilibrated solution consisting of 12.5% dimethylsulfoxide (DMSO) + 12.5% ethylene glycol (EG) + 75% PBS for 3 minutes. The embryos were then exposed to vitrification solution consisting of 25% DMSO + 25% EG + 50% PBS + 1.0 M of sucrose for 30 seconds. The embryos were loaded individually in 2 µl of vitrification solution, individually packaged, plunged directly into liquid nitrogen and stored for at least 4 months. For warming, straws and capillaries were removed from the nitrogen tank and exposed to air for 8 seconds at room temperature. To download the embryo, each container was immersed in an aliquot with 0.5 ml of warming solution consisting of 0.25 M sucrose + 4 ml PBS for 3 minutes. Thereafter, embryos were rehydrated in PBS + 0.15M sucrose solution (1 min). Subsequently, the embryo was placed in PBS and was morphologically evaluated using a stereo microscope. After warming, 19 embryos of group 1 (68%) remained as grade 1, while 9 embryos (32%) changed to grade 2; in group 2, 23 embryos (79%) remained as grade 1 and 6 embryos (21%) changed to grade 2. There was no effect of the container on the change of grade ( $P>0.05$ ). After warming, a single embryo was transferred to each recipient by laparoscopy. The pregnancy rate obtained was 37% (21/57), without difference between embryos vitrified in straws and capillary tubes (32% vs 41%;  $P>0.05$ ). The vitrification technique of goat blastocyst described in this work is efficient, inexpensive and easy to apply under field conditions and no differences in pregnancy rate were observed when embryos were vitrified in plastic straws or capillary tubes.

*Keywords:* Cryopreservation, Vitrification, Embryo, Caprine, Plastic Straw, Capillary tube

## CONTENIDO

	PAGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Antecedentes de la criopreservación	4
2.2 Características de los crioprotectores	4
2.3 Métodos de criopreservación	7
2.3.1 Congelación convencional	7
2.3.2 Vitricificación	8
2.4 Envases	9
2.4.1 Pajillas francesas de plástico de 0.25 ml	9
2.4.2 Pajillas OPS	9
2.4.3 Micropipeta de plástico de diámetro fino	10
2.4.4 Puntas plásticas	11
2.4.5 Rejillas de microscopía electrónica	11
2.4.6 Cryoloops	12
2.4.7 Malla de nylon	12
2.4.8 Micropipetas estiradas de vidrio	12
2.4.9 Tubos capilares de vidrio de 5 $\mu$ l	13
2.5 Vitricificación de embriones en caprinos	14
2.6 Evaluación embrionaria	15
2.6.1 Grado de desarrollo	15
2.6.2 Calidad morfológica	17
2.7 Supervivencia embrionaria	17
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	20
V. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1 Localización	21
5.2 Animales	21
5.3 Sincronización del ciclo estral y tratamiento de Superovulación	21

5.4	Preparación de las receptoras	22
5.5	Detección de celos y monta	22
5.6	Recolección de embriones	22
5.6.1	Preparación quirúrgica	22
5.6.2	Técnica quirúrgica	23
5.6.3	Búsqueda, evaluación y clasificación de embriones	24
5.7	Procedimiento de vitrificación	24
5.8	Calentamiento o desvitrificación	25
5.9	Transferencia de embriones	26
5.10	Seguimiento	27
5.11	Análisis estadístico	27
VI.	RESULTADOS	27
6.1	Sincronización de donadoras	27
6.2	Sincronización y manifestación de celo en las receptoras	28
6.3	Recolección de embriones	28
6.4	Evaluación embrionaria (calidad)	29
6.5	Diagnóstico de gestación y porcentaje de fertilidad	29
VII.	DISCUSIÓN	30
VIII.	CONCLUSIONES	37
IX.	LITERATURA CITADA	38
X.	ANEXO	44

## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, la criopreservación de embriones se ha convertido en una herramienta esencial para el mejoramiento de las técnicas de reproducción artificial, la preservación de especies en peligro de extinción y el transporte y propagación de material genético, entre otras diversas aplicaciones. Actualmente, hay dos técnicas para lograr la criopreservación exitosa de embriones; la primera es la congelación lenta (convencional) que se puede describir como una forma de crear un delicado balance entre varios factores que rodean al embrión y que pueden causar daño durante la congelación incluyendo la formación de cristales de hielo, fracturas de la zona pelúcida y daño tóxico y osmótico<sup>1</sup>. La segunda técnica es la vitrificación, la cual consiste en una solidificación parecida al vidrio sin la formación de cristales de hielo e involucra el uso de crioprotectores en altas concentraciones (>8 M) junto con una tasa de enfriamiento extremadamente rápida para prevenir el daño celular<sup>2-4</sup>. Bilton y Moore (1976)<sup>5</sup> fueron los primeros en lograr que un embrión de cabra fuera exitosamente criopreservado utilizando la técnica de congelación lenta y en 1990, Yuswiayti y Holtz<sup>6</sup>, lograron vitrificar exitosamente el primer embrión de cabra.

Los principales factores que afectan a la criopreservación de embriones son la especie, el volumen, el tipo y la concentración de los crioprotectores<sup>7</sup>, las tasas de enfriamiento y calentamiento<sup>3</sup>, la etapa de desarrollo<sup>8</sup> y el envase en el cual el embrión es almacenado para su criopreservación<sup>9</sup>.

Para mejorar la tasa de enfriamiento-calentamiento, la búsqueda del dispositivo óptimo (por ejemplo, pajilla francesa de plástico, pajilla *Open Pulled Straw* [OPS], rejillas de cobre de microscopía electrónica, mallas de nylon, micropipetas de plástico de diámetro fino, micropipetas de vidrio y tubos capilares de vidrio de 5 µl, entre otros) para ser usado en los protocolos de vitrificación de embriones ha sido el enfoque principal de diferentes investigaciones<sup>10-16</sup>. Estos dispositivos fueron diseñados para colocar la muestra en un volumen de medio de vitrificación muy pequeño (<5 µl), para

obtener mayores tasas de enfriamiento ( $>1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) y alcanzar así el estado parecido al vidrio. Las tasas de enfriamiento que se pueden lograr con estos dispositivos son usualmente altas, por ejemplo la pajilla OPS alcanza aproximadamente  $20,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y por lo tanto se requieren concentraciones mayores y más tóxicas de crioprotectores<sup>13, 17</sup>.

Un punto importante a considerar es el material con el que está fabricado el envase ya que dependiendo de la capacidad que este tenga para conducir calor, se podrán alcanzar mayores tasas de enfriamiento. Las pajillas francesas de plástico que permiten almacenar un volumen de 0.25 ml son utilizadas debido a su bajo costo, disponibilidad y fácil manejo; sin embargo, son de grandes dimensiones (1.7 mm de diámetro y 0.15 mm de grosor) por lo que requieren un mayor volumen de medio de vitrificación y/o están hechos de material menor conducción del calor, por lo tanto, el interés en este trabajo fue mejorar la transferencia de calor para lograr mayores tasas de enfriamiento ( $>1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) para la vitrificación a través del uso de un tubo capilar hecho de vidrio con una pared delgada ( $<0.4$  mm) y un diámetro interno menor (0.33 mm) con alta conductividad. Se ha demostrado que con el uso de envases estandarizados como los capilares de vidrio, se puede disminuir el volumen a utilizar y además se puede obtener una mayor velocidad de enfriamiento debido a la mayor conductividad de temperatura del vidrio<sup>9</sup>.

El envase en el que se vitrifican los embriones es determinante para su sobrevivencia y para mantener su integridad por lo que en este estudio se compararon dos tipos de envase (pajilla francesa de plástico de 0.25 ml y tubos capilares de vidrio de 5  $\mu\text{l}$ ) y se determinó con cuál de los dos se presentan menos alteraciones morfológicas al descongelamiento y que como consecuencia, pudieran resultar en mayores tasas de gestación. Se eligieron estos dos envases por sus características físicas, el volumen que permiten almacenar, la capacidad de transferencia de calor y principalmente por ser económicos, fáciles de manejar y porque son de fácil implementación en condiciones de campo.

También, en la mayoría de estos estudios la evaluación del comportamiento de los embriones caprinos al ser vitrificados se ha limitado a su estudio post-desvitrificación en condiciones de laboratorio, mientras que solo en algunos se han realizado técnicas *in vivo* que permitan determinar la viabilidad del embrión, su tasa de sobrevivencia y la capacidad de desarrollarse hasta llegar a una cría viable. Es por esto que en este estudio se evaluó la viabilidad de estos embriones al realizar la transferencia después de ser desvitrificados.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes de la criopreservación

La criopreservación es una técnica que permite el almacenamiento a largo plazo de células y tejidos de tal manera que estas células sean viables después del descongelamiento<sup>18, 19</sup>. La criopreservación de embriones ha simplificado el manejo de los recursos genéticos en especies domésticas y silvestres y es esencial en la tecnología comercial de la transferencia de embriones, permitiendo que el transporte de los embriones sea sencillo y económico, reduciendo los riesgos de transmisión de enfermedades y evitando la pérdida de animales durante el transporte. En los animales domésticos proporciona una alternativa para conservar la diversidad genética y para preservar el germoplasma de especies en peligro de extinción<sup>19, 20-24</sup>. La criopreservación de embriones de mamíferos fue posible en 1972, cuando Whittingham, Leibo y Mazur<sup>25</sup>, reportaron el congelamiento exitoso de un embrión de ratón en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L), resultando en la producción de una cría viable.

Los principales factores que afectan la viabilidad de embriones criopreservados son la especie, el tipo y la concentración del crioprotector, las tasas de enfriamiento y calentamiento, la calidad y la etapa de desarrollo embrionario, la toxicidad de los crioprotectores, la composición de la solución crioprotectora, el tiempo de exposición, la composición proteica del medio crioprotector y la elección de la técnica de criopreservación ya sea congelación lenta o vitrificación<sup>1, 26</sup>.

### 2.2 Características de los crioprotectores

Los embriones son congelados añadiendo en el medio sustancias denominadas crioprotectoras, que modifican el comportamiento físico de la solución y protegen a las células de los daños asociados al descenso térmico. Los requerimientos de un buen crioprotector son una alta permeabilidad y baja toxicidad<sup>27</sup>. Los agentes crioprotectores son solutos orgánicos que son

utilizados para proteger a los organelos intracelulares durante el almacenamiento por largo tiempo en nitrógeno líquido. Los crioprotectores penetrantes intracelularmente interactúan para influenciar la dinámica entre microfilamentos y microtúbulos. Sin embargo, las altas concentraciones de los crioprotectores requeridas para la vitrificación se tornan tóxicas para las células<sup>28</sup>.

Para superar la toxicidad de los crioprotectores se han adoptado diferentes técnicas. La adición de macromoléculas y azúcares resulta en la reducción de la toxicidad química de los crioprotectores<sup>29</sup>. Las macromoléculas y los azúcares ayudan en la formación de un vidrio estable a bajas temperaturas, controlan la tasa de permeabilidad de los crioprotectores resultando en la prevención de una excesiva hinchazón antes (equilibrio) y después (dilución) del descongelamiento, y aumentan la viscosidad de la solución mientras disminuye la concentración del crioprotector penetrante y disminuyendo la toxicidad<sup>30</sup>.

Estas sustancias pueden penetrar o no la membrana plasmática de las células embrionarias (crioprotectores penetrantes y no penetrantes, respectivamente). Los agentes penetrantes como el glicerol, el etilenglicol (EG), el dimetilsulfoxido (DMSO) y el propilenglicol son los más ampliamente usados y su mecanismo de acción es el de reemplazar el agua intracelular antes del enfriamiento, lo cual en combinación con una tasa de descenso térmico lenta y controlada, reducen los cambios de volumen celular y minimizan la cristalización intracelular<sup>31, 32</sup>. Entre los 5 principales agentes penetrantes, el EG es el menos tóxico, seguido del glicerol.

En protocolos típicos de vitrificación, la probabilidad de formación de cristales de hielo se reduce incrementando la viscosidad a través de un incremento en la concentración de los crioprotectores<sup>33</sup>. El etilenglicol tiene un peso molecular relativamente bajo (62.07) comparado con otros crioprotectores (Glicerol: 92.1; DMSO: 78.13; Propilenglicol: 76.1) lo que le permite una rápida entrada durante el equilibrio y su rápida salida durante la dilución<sup>30</sup>.

En blastocistos bovinos, el EG y el glicerol son menos tóxicos que el propilenglicol<sup>34</sup>, pero la toxicidad relativa de varios agentes puede no ser la misma en otras etapas de desarrollo o en otras especies<sup>20</sup>. En embriones caprinos, el EG es considerado el crioprotector más adecuado<sup>35</sup> y el glicerol también ha probado ser un crioprotector exitosamente utilizado en embriones de cabra<sup>36, 37</sup>. Sin embargo, al utilizarse el glicerol en embriones de rumiantes, existe la desventaja de que este requiere ser eliminado completamente de los embriones antes de ser transferidos. Inmediatamente después de la descongelación, es indispensable eliminar rápidamente el crioprotector para favorecer la supervivencia del embrión. Las células que presentan una concentración elevada de crioprotector no deben ser colocadas directamente en un medio isotónico. En tal caso, las diferencias de presión osmótica provocarían una entrada demasiado rápida de agua en la célula con el riesgo de que la célula se hinche y reviente. Es necesario proceder a la eliminación progresiva del crioprotector, de manera que los flujos de la salida de crioprotector y de entrada de agua sean compatibles con la permeabilidad de la membrana plasmática. La eliminación de crioprotector por etapas se efectúa en forma inversa a la de adición del crioprotector. Para ello se pasan sucesivamente los embriones en diferentes medios, con concentraciones decrecientes (por ejemplo, glicerol 1.5 M, después 1.0 M, 0.5 M y por último 0 M. La duración de cada paso es de 5 a 10 minutos<sup>38</sup>.

Los crioprotectores no penetrantes (azúcares tales como sacarosa o la trealosa) ejercen su acción a través de un aumento extracelular en la osmolaridad de las soluciones de criopreservación, promoviendo la deshidratación celular y disminuyendo la formación y el tamaño de los cristales de hielo<sup>32</sup>. La inclusión de sacarosa en la solución de congelamiento o vitrificación promueve la contracción y reduce la cantidad intracelular del crioprotector, lo cual ayuda a evitar que las células tengan cambios osmóticos drásticos cuando son puestos en contacto con la solución de vitrificación<sup>12, 20</sup>. Los crioprotectores pueden ser empleados en diferentes combinaciones y concentraciones para minimizar la toxicidad que tiene cada uno de ellos por

separado<sup>19, 21, 27, 39</sup>. El mecanismo de acción de los crioprotectores se considera que es el mismo, pero la toxicidad y las propiedades permeables de cada uno son muy diferentes y tienen efectos significativos en la sobrevivencia de los embriones criopreservados<sup>20, 31</sup>.

### 2.3 Métodos de criopreservación

Actualmente, los métodos más utilizados para criopreservar embriones son la congelación convencional (o lenta) y la vitrificación. La vitrificación proporciona beneficios en embriones que tienen baja viabilidad post criopreservación, como es el caso de los embriones producidos *in vitro*<sup>32, 40</sup>.

#### 2.3.1 Congelación convencional

La congelación convencional (o también llamada “congelación lenta”) es una técnica de criopreservación en la que existe un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la velocidad de la formación de núcleos de hielo. Esta técnica está diseñada para mantener un delicado balance entre el crioprotector a bajas concentraciones (1-1.5 M) y los compartimientos acuosos del embrión<sup>19</sup>. Su objetivo principal es el de controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que descienda la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula manteniendo el equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de causar daño al embrión por la formación de cristales de hielo intracelulares<sup>41</sup>.

Una velocidad lenta de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentración de electrolitos intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas de la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto o el contacto entre células<sup>11, 19, 41</sup>. Para prevenir la formación de hielo intracelular o minimizar el daño que este pueda causar, todos los protocolos de congelación tienen como principio

deshidratar las células<sup>23, 24</sup>. El éxito de un protocolo de congelación lenta se basa en alcanzar el equilibrio entre la velocidad a la que el agua abandona la célula y la velocidad con que esta agua se convierte en hielo regulada por la molaridad del crioprotector<sup>41</sup>.

### 2.3.2 Vitrificación

La congelación lenta se emplea en la mayoría de las especies. Sin embargo, en años recientes se ha considerado el uso de un método de criopreservación extremadamente rápido llamado vitrificación o “ultracongelación”, el cual fue creado en 1985 por Rall y Fahy<sup>42</sup> y en el que se elimina totalmente la formación de cristales de hielo, lográndose un estado parecido al vidrio. En esta técnica los embriones son suspendidos en soluciones crioprotectoras muy concentradas y sumergidos directamente en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L)<sup>20</sup>. La vitrificación emplea crioprotectores con una alta viscosidad tales como el etilenglicol<sup>43</sup> para consolidar el estado parecido al vidrio, disminuyendo los daños causados por el enfriamiento, pasando rápidamente por la zona de mayor peligro que está situada entre los +15°C y los -5°C<sup>3, 11, 19, 24, 41, 44</sup>. Comparada con la congelación convencional, la vitrificación simplifica el proceso de criopreservación, reduce el tiempo requerido, evita el uso de equipo costoso y proporciona una mayor viabilidad de los embriones producidos *in vitro*<sup>19, 23, 24</sup>. También elimina todos los daños físicos y químicos causados por la formación extracelular de hielo. Durante la vitrificación, la viscosidad del citosol se va haciendo mayor hasta que las moléculas son inmovilizadas y pierde su estado líquido, y adquiere las propiedades de un sólido<sup>45</sup>. De hecho, se conoce que los factores más importantes para una buena vitrificación son la viscosidad de la muestra, el mínimo volumen posible o tamaño de la gota y el máximo ritmo de congelamiento<sup>27</sup>. La relación entre estos tres factores se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Probabilidad de vitrificación} = \frac{\text{Tasa de enfriamiento} \times \text{Viscosidad}}{\text{Volumen}} \quad 46$$

Sin embargo, la vitrificación no ha sido aceptada como una técnica de rutina por los practicantes de la transferencia embrionaria, debido a la diversidad de técnicas y a la falta de una tecnología estándar y probada<sup>3, 20, 47, 48</sup>.

## 2.4 Envases

### 2.4.1 Pajillas francesas de plástico de 0.25 ml

El primer envase usado exitosamente en el proceso de vitrificación de ovocitos y embriones de ratón fue la pajilla francesa de 0.25 ml empleada para la conservación de semen<sup>42</sup>, esta tiene un diámetro interno de 1.7 mm y una pared de 0.15 mm que le permite utilizar muestras con alto volumen (250  $\mu$ L) y alcanzar una tasa de enfriamiento y calentamiento de  $\approx 2500$  °C/min<sup>49</sup>.

De acuerdo con He *et al.*<sup>17</sup> los envases han sido significativamente mejorados desde entonces, llevando al desarrollo de dispositivos mucho más eficientes. Casi todos los dispositivos intentan utilizar volúmenes mínimos de crioprotectores y altas tasas de enfriamiento a fin de minimizar las lesiones en la célula y el daño tóxico causado por el proceso de vitrificación<sup>26</sup>.

### 2.4.2 Pajillas OPS

Inicialmente la vitrificación se hizo utilizando como envase ampolletas, posteriormente se hizo en pajillas y, por último, el método de pajilla abierta y estirada<sup>a</sup>. Aunque el método OPS es fácil de usar, su desventaja radica en que estas tienden a flotar después de la inmersión en el N<sub>2</sub>L, lo que conlleva a una disminución en la velocidad de congelamiento, posible daño al embrión y dificultades durante el almacenamiento. Además su uso y manipulación

---

<sup>a</sup> Son mini pajillas francesas de plástico de 0.25 ml que son suavemente calentadas sobre una placa caliente y estiradas manualmente hasta que el diámetro interior disminuye de 1.7 mm a aproximadamente 0.8 mm y hasta que el grosor de la pared de la parte central disminuye de 0.15 mm a aproximadamente 0.07 mm. Posteriormente las pajillas son enfriadas en el aire y luego cortadas por la parte más delgada (Vajta *et al.*, 1998).

requiere de habilidad manual lo que implica ser manejadas por un técnico experimentado<sup>11, 13</sup>.

Las pajillas OPS tienen un diámetro de 0.8 mm y una pared de 0.07 mm, lo que les permite alcanzar tasas de enfriamiento y calentamiento por arriba de los 20,000 °C/min, disminuyendo el daño celular tóxico y osmótico<sup>50</sup>. La OPS ha sido efectivamente utilizada para vitrificar embriones en estado de pre-implantación debido a sus características geométricas que permiten que las tasas de intercambio de temperatura se realicen con mayor rapidez<sup>51</sup>. Sin embargo, el uso de pajillas OPS tiene la desventaja de que al ser hechas a mano pueden provocar resultados variables debido a diferencias en el diámetro causadas por la manipulación del operador; mientras que las pajillas OPS que están disponibles de manera comercial no presentan esta desventaja pero son más costosas que las pajillas convencionales de 0.25 ml utilizadas para almacenar semen<sup>9, 51</sup>.

El método OPS ha sido utilizado para vitrificar ovocitos y embriones de mamífero dando mejores tasas de éxito que aquellos obtenidos con pajillas normales<sup>11, 50</sup>. La técnica de vitrificación con pajillas OPS para embriones de cabra en etapa de blastocisto produce mayores tasas de éxito, ya que la sobrevivencia embrionaria asciende significativamente, de 42% para la congelación lenta a 64% con OPS (4). En 2007, Niasari-Naslaji *et al.*<sup>51</sup> compararon el uso de pajillas OPS y puntas plásticas de micropipetas y concluyeron que no existía diferencia significativa en la proporción de embriones bovinos que se re-expandieron o en la proporción de embriones eclosionados después de la desvitrificación.

#### 2.4.3 Micropipeta de plástico de diámetro fino

La misma pajilla utilizada en el método OPS pero modificada permite que el diámetro interno sea reducido de 0.88 mm a 0.36 mm con una pared de 0.077 mm y que el volumen de solución utilizado para vitrificación sea menor (0.5 µl vs 1-2 µl en OPS). A esta pajilla se le conoce como “micropipeta de plástico de

diámetro fino”. El diámetro y el volumen son factores que podrían explicar por qué con el simple procedimiento de alargarlas con calor se obtiene una tasa de sobrevivencia total de 73% para mórulas compactas y un 82% para blastocistos, así como una baja incidencia de fracturas de zona pelúcida (1/63, 1.6%) en embriones humanos<sup>16</sup>.

#### 2.4.4 Puntas plásticas

Una de las ventajas de utilizar las puntas plásticas es que permite disminuir considerablemente los costos debido a que las pajillas OPS tienen un elevado precio (\$2.90 US) en comparación con las puntas plásticas (\$0.09 US). Sin embargo, los materiales plásticos tienen baja conductividad del calor (0.2WmK), lo que limita las tasas de enfriamiento. Utilizando otros materiales con alta conductividad del calor tales como el cristal (0.8WmK), se puede mejorar la transferencia de calor y alcanzar tasas de enfriamiento más rápidas, hasta alcanzar más de 20,000 °C/min<sup>17</sup>.

#### 2.4.5 Rejillas de microscopía electrónica

Otro dispositivo utilizado son las “rejillas de cobre de microscopía electrónica” (ME), que tienen un diámetro de 3.05 mm y 0.037 mm de espesor y se utilizan para obtener tasas de enfriamiento muy elevadas. Este dispositivo fue primeramente utilizado para vitrificar ovocitos en volúmenes de solución muy pequeños (<1µl). En un estudio realizado en 1996, y para reducir aún más el volumen, la parte inferior de la rejilla fue transferida a una membrana celular milli (Millipore, Bedford, MA) dejando a los ovocitos expuestos. Después las rejillas se sumergieron en N<sub>2</sub>L con la ayuda de unas pinzas obteniéndose un 40% (60/150) de ovocitos que iniciaron su división después de ser inseminados *in vitro* y 15% (9/60) alcanzaron la etapa de blastocisto conservando su morfología intacta<sup>10</sup>. Sin embargo, la manipulación y recuperación de los ovocitos y embriones después de utilizar esta técnica es problemática.

#### 2.4.6 Cryoloops

Existe una técnica de vitrificación que utiliza unos envases llamados “cryoloops”<sup>b</sup> que permite una fácil manipulación durante la vitrificación y la desvitrificación. Esta técnica ha sido modificada de un procedimiento de rutina utilizado en la técnica de congelamiento de los cristales de proteína para la recopilación de datos a temperaturas criogénicas. Los embriones son suspendidos en un cryoloop y sumergidos directamente en N<sub>2</sub>L. Con el uso de los cryoloops han sido vitrificados exitosamente ovocitos y embriones de hámster y bovino<sup>12</sup>. Las rejillas y los cryoloops tienen las tasas más altas de congelación debido al volumen extremadamente pequeño de medio de vitrificación y el contacto directo con el N<sub>2</sub>L.

#### 2.4.7 Malla de nylon

La malla de nylon es un filtro de membrana que permite vitrificar grandes cantidades de ovocitos y embriones. Este dispositivo tiene la capacidad de almacenar de 10 hasta 65 complejos ovocito-células del cumulus<sup>14</sup>. Si se utiliza una malla con un tamaño de poro muy pequeño (60 µm) se puede disminuir el volumen de solución que contiene los embriones. Una desventaja del uso de la malla de nylon es que no permite una correcta identificación de los embriones, además de que existe riesgo de contaminación al estar en contacto directo con el N<sub>2</sub>L.

#### 2.4.8 Micropipetas estiradas de vidrio

Utilizando otros materiales con alta conductividad del calor tales como el vidrio (0.8WmK), se puede mejorar la transferencia de calor y alcanzar tasas de enfriamiento más rápidas, superiores a los 20,000 °C/min<sup>17</sup>. Las tasas de

---

<sup>b</sup> Los cryoloops utilizados para la vitrificación consisten en un lazo de nylon (20 mm de ancho, 0.5-0.7 mm de diámetro) montado en un tubo de acero inoxidable insertado en la tapa de un cryovial. Para la vitrificación, los blastocistos son colocados en el cryoloop que fue previamente recubierto con una capa fina de crioprotector. Los blastocistos en el cryoloop son colocados dentro del cryovial, el cual es llenado, sellado y sumergido en N<sub>2</sub>L.<sup>12</sup>

enfriamiento y calentamiento pueden ser mejoradas utilizando micropipetas estiradas de vidrio GMP (por sus siglas en inglés Glass Micro Pipette), debido a la alta conductividad del calor del vidrio, un reducido tamaño del capilar (0.33 mm de diámetro interno) y un volumen para cargar al embrión más pequeño (1-2  $\mu\text{L}$ )<sup>13</sup>.

Las GMP's son hechas a mano a partir de una pipeta capilar de vidrio que es estirada hasta que su diámetro exterior de la parte central disminuye de 1.0 mm a aproximadamente 0.3 mm, y que posteriormente son enfriadas en el aire y cortadas en el punto más estrecho. En diversos experimentos se ha comprobado que las GMP permiten tasas de enfriamiento y calentamiento más altas comparadas con la OPS (diámetro interno 0.3 mm vs 0.8 mm), evitando el daño embrionario y aumentando las tasas de viabilidad<sup>9, 13, 15</sup>. En un estudio realizado por Cho *et al.*<sup>15</sup> se obtuvieron tasas de re-expansión de blastocistos bovinos significativamente diferentes entre el método OPS (79.6%) y el método con GMP (90.4%), concluyendo que con este envase se obtienen altas tasas de sobrevivencia embrionaria. No obstante, las GMP son envases hechos a mano y no permiten controlar los volúmenes cargados y los parámetros estándar permitidos por las pipetas<sup>52</sup>. Además de que tienen la desventaja de ser frágiles<sup>15</sup>.

#### 2.4.9 Tubos capilares de vidrio de 5 $\mu\text{l}$

Es bien sabido que un incremento en las tasas de enfriamiento resulta en una mayor sobrevivencia embrionaria<sup>11, 17</sup>. El aumento en las tasas de enfriamiento es un parámetro importante en el proceso de vitrificación, debido a que el paso a través de una temperatura crítica es más rápido cuando se compara con los métodos de vitrificación convencionales<sup>50</sup>. La tasa de enfriamiento esta directamente influenciada por la temperatura, la conductividad de calor de los envases y el volumen de medio de mantenimiento que rodea al embrión. Un volumen de vitrificación mínimo incrementa las tasas de enfriamiento y calentamiento y disminuye los cambios en la formación de cristales en muestras pequeñas<sup>2</sup>. Se ha demostrado en estudios previos que los envases

de vidrio mejoran las tasas de sobrevivencia embrionaria cuando se comparan con envases de plástico como las pajillas OPS<sup>13, 15</sup>. El uso de envases estandarizados tales como los tubos capilares de vidrio GMC (por sus siglas en inglés Glass Micro Capillary) permiten alcanzar elevadas tasas de enfriamiento debido a la alta conductividad de temperatura del vidrio<sup>9</sup>. Los capilares comerciales de vidrio de 5 µl proporcionan volúmenes estándar (2 µl) evitando el uso de los GMP hechos a mano; y una conveniente manipulación del envase ya sea durante procedimientos por pasos o dentro del N<sub>2</sub>L, por lo que se consideran como una de las mejores opciones para la vitrificación de embriones<sup>52</sup>.

## 2.5 Vitrificación de embriones en caprinos

Desde 1987, año en el que Massip *et al.*<sup>53</sup> lograron el nacimiento del primer ternero producto de la transferencia de un embrión vitrificado, las investigaciones con respecto a la vitrificación se han enfocado en probar distintos protocolos en varias especies principalmente en bovinos, ovinos, porcinos y equinos, mientras que en cabras la información no es tan abundante<sup>21, 31</sup>.

En cabras, los primeros embriones criopreservados exitosamente fueron reportados por Bilton y Moore en 1976<sup>5</sup>. Las primeras crías de cabra nacidas por transferencia de embriones vitrificados fueron reportadas por Yuswiati y Holtz<sup>6</sup> y por Traldi *et al.*<sup>54</sup>.

En 1993, Le Gal *et al.*<sup>35</sup> realizaron un estudio en el cual demostraron que los embriones de cabra vitrificados en etapa de blastocisto mostraron un mejor desarrollo *in vitro* (40.3%) que los vitrificados en etapa de mórula (14.3%) independientemente del crioprotector usado (etilenglicol o glicerol).

En 2001, El Gayar y Holtz<sup>4</sup> realizaron la primera transferencia de embriones de cabra utilizando la técnica OPS obteniendo una tasa de sobrevivencia embrionaria de 64%.

Así mismo, en 2007, Hong *et al.*<sup>39</sup> hicieron un estudio en el cual determinaron el efecto de diferentes soluciones de vitrificación sobre el desarrollo *in vivo* de mórulas y blastocistos después de la transferencia embrionaria y concluyeron que utilizando el método OPS y un medio que contuviera 15% de etilenglicol y 15% de DMSO permitía obtener una tasa de nacimientos del 51.4%, siendo este un método sencillo y eficiente para la vitrificación de mórulas y blastocistos de cabra.

Chen *et al.*<sup>55</sup> reportan una tasa de desarrollo hasta blastocisto de cabra de 47.1% (8/17), obtenida mediante la técnica de cultivo *in vitro* de células tomadas del embrión producido *in vivo*, una tasa de gestación de 37.5% (3/8) con embriones producidos *in vivo*, vitrificados y transferidos mediante la técnica de laparoscopia y diagnosticada a los 40 días usando ultrasonografía en tiempo real y una tasa de sobrevivencia embrionaria de 25% (2/8) calculada de acuerdo al número de crías nacidas/recipiente transferida.

En el año 2010, también Al Yacoub *et al.*<sup>8</sup> informaron que utilizando la técnica OPS se obtienen tasas de sobrevivencia embrionaria del 70% en embriones caprinos vitrificados en etapa de blastocisto, comparado con un 42% obtenido con la técnica de congelación convencional.

## 2.6 Evaluación embrionaria

La evaluación embrionaria que se realiza de forma rutinaria en la práctica, contempla dos aspectos importantes: el grado de desarrollo del embrión (acorde al tiempo posterior al inicio del celo) y la calidad morfológica (aparición del embrión al observarlo al microscopio estereoscópico).

### 2.6.1 Grado de desarrollo

Se refiere a la etapa del desarrollo del embrión en relación al día en que son recolectados. Los embriones que presentan retraso en el desarrollo superior a 48 horas no se consideran transferibles. De esta forma, un embrión recolectado

del día 6 al 7 después del inicio del celo, normalmente debe haber alcanzado el estadio de mórula compacta o blastocisto. Los embriones recolectados el mismo día pueden mostrar diferencias en el desarrollo embrionario, fenómeno que se observa frecuentemente entre los embriones de una misma donadora o de donadoras diferentes de una misma especie. En el momento de la recolección (por ejemplo, al día 7 post estro), algunos de los embriones pueden presentar un ligero retraso en el desarrollo (mórula compacta) mientras que otros pueden estar más adelantados (blastocistos eclosionados)<sup>38</sup>.

Con la finalidad de unificar y simplificar el comercio internacional, la International Embryo Transfer Society (IETS) citada por Romo *et al.*<sup>56</sup> ha establecido códigos internacionales para los sucesivos estadios de desarrollo embrionario, los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación embrionaria de acuerdo a la etapa de desarrollo según la IETS

Clasificación	Grado de desarrollo
1	Ovocito (sin fertilizar)
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula (compacta)
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto eclosionado
9	Blastocisto eclosionado expandido

Tomado de Romo *et al.*<sup>56</sup>

## 2.6.2 Calidad morfológica

La calidad de los embriones es otra variable que se considera como un factor de éxito de la técnica de transferencia; la sobrevivencia de los embriones que no presentan algún defecto visible es siempre considerablemente superior a la de los embriones de calidad inferior<sup>57-59</sup>. La calidad del embrión y su clasificación se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación embrionaria de acuerdo a la calidad según la IETS

Clasificación	Calidad	Características
1	Excelente	Embriones compactos y esféricos; simétricos; células de tamaño, color y textura uniformes, sin gránulos en el citoplasma con pocas vesículas pequeñas y espacio perivitelino vacío.
2	Bueno	Embriones con ligera asimetría; algunos blastómeros extruidos y un ligero retardo en su desarrollo.
3	Regular	Ligero grado de degeneración; blastómeros esféricos dispares, poco compactos y de tamaño variable; retardo de 1 a 2 días en su desarrollo; masa celular aparentemente viable pero con grandes vesículas entre las células y superficie irregular; color muy claro o muy oscuro y material de desecho en el espacio perivitelino.
4	Degenerado	Embriones con zona pelúcida rota; blastocele no visible con grandes zonas de degeneración; poca cantidad de células y blastómeros sueltos de diferentes tamaños.

Tomado de Romo *et al.*<sup>56</sup>

## 2.7 Sobrevivencia embrionaria

Estudios actuales confirman que el factor principal que afecta la sobrevivencia y el potencial de desarrollo de embriones ovinos obtenidos *in vivo* expuestos a

procedimientos de congelación y descongelación es su etapa de desarrollo al momento de la criopreservación<sup>59</sup>.

Estudios previos que se llevaron a cabo con etapas embrionarias avanzadas (mórulas y blastocistos)<sup>60, 61</sup> indican que en ovejas, así como en bovinos<sup>62</sup>, el blastocisto es la etapa que sobrevive mejor a la congelación convencional. Los embriones en etapas tempranas parecen ser más difíciles de criopreservar eficientemente<sup>58, 63, 64</sup>.

La tasa de criosobrevivencia de embriones de oveja a varias etapas de desarrollo indican que embriones en etapa de división celular son altamente sensibles a los procedimientos de criopreservación *per se*. La sobrevivencia de embriones a la congelación y descongelación aumenta conforme progresa el desarrollo, con un sustancial incremento entre la etapa de mórula y blastocisto<sup>59</sup>.

El blastocisto parece ser la etapa más adecuada para la criopreservación de embriones caprinos con tasas de sobrevivencia embrionaria superiores al 50% (59%<sup>65</sup>; 64%<sup>4, 66</sup>; 70%<sup>8</sup>; 88.8%<sup>67</sup>). Por motivos aún no comprobados, se ha observado que las mórulas de cabra muestran mayor variabilidad en cuanto a los porcentajes de gestación obtenidos en comparación con los blastocistos<sup>8, 66</sup>. Se ha encontrado que la asociación de células en las mórulas tempranas y mórulas compactas de cabra es más débil comparada con las mórulas de bovino y ovino después de la criopreservación<sup>68</sup>. Las posibilidades de clasificar erróneamente a los embriones morfológicamente hablando son mayores en la etapa de mórula, lo que podría resultar en la transferencia de embriones que no tienen la capacidad de desarrollarse correctamente<sup>69</sup>.

Se cree que la diferencia en sobrevivencia entre blastocistos y mórulas en cabras podría atribuirse a la variación en la sensibilidad de los agentes crioprotectores o a los procedimientos de vitrificación y a la determinación de una concentración óptima del crioprotector utilizado<sup>8, 66</sup>.

El incremento en las tasas de criosobrevivencia con etapas más avanzadas parece estar relacionado con un número mayor de células y el tamaño pequeños de las mismas<sup>70</sup>, lo cual mejora la criotolerancia a la congelación cuando se compara con etapas embrionarias más tempranas que tienen menos células de mayor tamaño<sup>71</sup> con escasos contactos de unión entre los blastómeros<sup>72</sup>. La permeabilidad de los crioprotectores podría ser menor en esta etapa de desarrollo<sup>73</sup> y el daño a los componentes intracelulares podría ser una causa muy importante de criolesión<sup>63</sup>.

Por lo mencionado anteriormente, se determinó que para la realización de este estudio se utilizarían embriones en etapa de blastocisto únicamente. Así mismo, se determinó realizar la técnica de transferencia para poder determinar la viabilidad del embrión, su tasa de sobrevivencia y la capacidad de desarrollarse hasta llegar a una cría viable. Como se ha mencionado, el envase en el que se vitrifiquen los embriones es determinante para su sobrevivencia y para mantener su integridad por lo que en este estudio se compararon dos tipos de envase para determinar con cuál de los dos se presentan menos alteraciones morfológicas al descongelamiento y que por lo mismo, resulte en una mayor tasa de gestación.

### III. HIPÓTESIS

La viabilidad de embriones caprinos a la desvitrificación y transferencia es mayor al utilizar tubos capilares de vidrio de 5  $\mu$ l en comparación con pajillas francesas de 0.25 ml.

### IV. OBJETIVOS

#### General

Evaluar el efecto del envase utilizado en el proceso de vitrificación sobre la calidad y la supervivencia de embriones caprinos utilizando tubos capilares de vidrio de 5  $\mu$ l y pajillas de 0.25 ml.

#### Específicos

- Evaluar el efecto que tiene la vitrificación sobre la integridad morfológica de los embriones a su desvitrificación.
- Determinar el porcentaje de viabilidad de los embriones a partir de la tasa de gestación que se obtiene cuando se utilizan tubos capilares de vidrio de 5  $\mu$ l y/o pajillas de plástico de 0.25 ml como recipientes para su almacenaje.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Localización

El trabajo se realizó durante el periodo comprendido entre los meses de junio - noviembre de 2011 en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el municipio de Puente de Ixtla, Morelos.

### 5.2 Animales

Se utilizaron 10 cabras de raza Nubia como donadoras de embriones y 65 cabras criollas como receptoras con una edad promedio de 3 años. Se buscó que ninguna receptora fuera primala para evitar distocias al parto. Todas recibieron un tratamiento de desparasitación, fueron vitaminadas y se les proporcionó un suplemento alimenticio 45 días antes de ingresar al programa de superovulación y transferencia de embriones con base en un concentrado comercial (300 gr/día, a cada cabra) con 14 % de PC y 2.9 mega calorías de EM/Kg<sup>74</sup>. El consumo de agua fue a libre acceso. Se buscó que la condición corporal de las donadoras al momento de la superovulación fuera de 3.0 en promedio (en una escala de 1 a 5)<sup>75</sup>. Las 10 donadoras fueron seleccionadas en plena época reproductiva (Mayo-Enero).

### 5.3 Sincronización del ciclo estral y tratamiento de superovulación

Las donadoras se sincronizaron durante 12 días utilizando dispositivos intravaginales de liberación controlada (Control Internal Drug Release - CIDR), que contienen 300 mg de progesterona natural. La superovulación en las cabras donadoras de embriones se realizó 4 días antes de retirar el dispositivo con 180 mg de Hormona Folículo Estimulante de origen porcino (pFSH<sup>°</sup>) como

---

<sup>°</sup> Folltropin V, Vetrepharm-Canadá

dosis total, aplicada en dosis decrecientes por vía intramuscular, cada 12 horas durante 4 días bajo el siguiente esquema de dosificación<sup>76</sup>:

Tabla 3. Protocolo de superovulación (180 mg FSH), aplicado en dosis decreciente

Mañana	Tarde
40 mg	30 mg
30 mg	20 mg
20 mg	20 mg
10 mg	10 mg

#### 5.4 Preparación de las receptoras

Los embriones vitrificados permanecieron almacenados en N<sub>2</sub>L durante 4 meses. Las receptoras fueron sincronizadas utilizando esponjas intravaginales impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA<sup>d</sup>), que se retiraron a los 12 días. Al retiro de la esponja se aplicaron 300 U.I de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) vía intramuscular en dosis única<sup>77</sup>.

#### 5.5 Detección de estros y monta

En las cabras donadoras superovuladas y receptoras se detectaron estros 24 horas después de retirados los dispositivos intravaginales, dos veces al día, con un macho recelador provisto de un mandil. Las donadoras que presentaron estro conductual (día cero del ciclo estral), recibieron monta dirigida con un semental de fertilidad probada cada ocho horas, mientras permanecieron receptoras. Se utilizaron dos sementales de forma alternada.

#### 5.6 Recolección de embriones

##### 5.6.1 Preparación quirúrgica

---

<sup>d</sup> Chronogest®, Intervet, México

La recolección de los embriones se realizó entre los días 6.5-7 posteriores al estro dependiendo de la hora en que fueron detectadas en celo mediante la técnica de laparotomía medio ventral con el fin de obtener embriones en etapa de blastocisto. A las cabras se les retiró el alimento 24 horas previas a la cirugía y el agua 12 horas antes. La anestesia se realizó con la aplicación de hidrocloreto de Xilacina al 2% (0.3mg/kg) por vía intramuscular y Ketamina (2mg/kg) por vía endovenosa<sup>78</sup>.

### 5.6.2 Técnica Quirúrgica

Para realizar la cirugía se rasuró y desinfectó el área quirúrgica (región abdominal ventral). Se realizó una incisión de 5 cm de largo sobre la línea media, a 3 cm de distancia de la ubre como punto de inicio. Se exteriorizaron los cuernos uterinos para poder observar la respuesta a la superovulación de los 2 ovarios.

El lavado de los cuernos uterinos se realizó por separado de la siguiente manera: se puncionó la base del cuerno con un catéter intravenoso (14G x 5 ½), para facilitar la introducción de la sonda de Foley (calibre 10 G) hacia la luz del cuerno uterino. En la punta del cuerno uterino se introdujo otro catéter intravenoso (18G x 5 ¼) a través de este se aplicaron de 40 a 60 ml de solución Dulbecco modificada a 30°C, adicionada con 0.4% de albúmina sérica bovina, 2500 UI/ml de Penicilina G sódica y 250 mg/ml de Sulfato de Estreptomina, que fueron colectados por la sonda colocada caudalmente a un filtro concentrador (Emcon).

Concluido el lavado de los cuernos uterinos, se suturó el orificio por donde se introdujo la sonda de Foley, se lavó la superficie externa de los cuernos con Solución Salina Fisiológica y se regresaron a la cavidad abdominal. Se suturó el peritoneo y la línea media con puntos en "X" (Vicryl – 00). La piel se suturó con puntos en "U" (Nylon 1)<sup>79</sup>. Después de realizada la recolección, a las donadoras se les aplicaron antibióticos (Penicilina-Estreptomina,

Estreptobenzetacil<sup>e</sup>), a una dosis de 12000 UI/kg, por vía intramuscular) como medida preventiva y evitar infecciones. Así mismo se les aplicó una dosis de prostaglandina PGF2 $\alpha$ <sup>f</sup> (15 mg vía intramuscular).

### 5.6.3 Búsqueda, evaluación y clasificación de embriones

Para realizar la búsqueda de los embriones, el medio recolectado se depositó en una caja de petri cuadrículada, y se observó en un microscopio estereoscópico<sup>g</sup> con un aumento de 4 a 10 X y se clasificaron según los criterios empleados por la IETS citado por Romo et al.<sup>56</sup> mencionados anteriormente. Los embriones para su evaluación, se lavaron y se mantuvieron en un medio comercial<sup>h</sup>.

La evaluación y clasificación de los embriones se realizó de acuerdo a su estadio de desarrollo y calidad (mórula y blastocisto, calidad 1, 2, 3, 4 y ovocitos). En este trabajo únicamente se consideraron a los embriones en etapa de blastocisto de calidad 1 y 2 para ser vitrificados.

### 5.7 Procedimiento de vitrificación

Los cincuenta y siete embriones obtenidos fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos. Grupo 1: Pajilla francesa de plástico de 0.25 ml y Grupo 2: Tubo capilar de vidrio de 5  $\mu$ l. Cada envase (pajilla o capilar) se identificó, especificando el número de la donadora, el estadio de desarrollo y la calidad del embrión.

La vitrificación se realizó en base al protocolo propuesto por Rall y Fahy<sup>42</sup>, adaptado por Seidel y Walker<sup>80</sup> con modificaciones<sup>82</sup> que consta de los siguientes pasos:

---

<sup>e</sup> Fort Dodge

<sup>f</sup> Luprostiol, Virbac

<sup>g</sup> Leica®

<sup>h</sup> Biolife, Agtech

1.- Los embriones se lavaron con medio de mantenimiento (Holding Plus, Vigro; Lab. Bioniche) a 35° C 5 veces para descartar sustancias extrañas o detritus celulares.

2.- Para su clasificación según los criterios establecidos por la IETS, fueron colocados en medio de mantenimiento.

3.- Los embriones se colocaron en 200 µl del medio 1 compuesto por 12.5% de DMSO + 12.5% de EG + 75% PBS (solución fosfatada bufferada) durante 3 minutos a 35° C.

4.- Posteriormente se pasaron al medio 2 compuesto por 25% de DMSO + 25% de EG + 50% de PBS + 1.0M de sacarosa, durante 30 segundos a 35° C.

5.- Los embriones contenidos en solamente 2 µl del medio 2 (volumen final) se cargaron en la parte media de los tubos capilares de vidrio de 5 µl o en pajillas francesas de 0.25 ml (un embrión por envase). Los embriones se envasaron a temperatura ambiente. Inmediatamente después fueron introducidos en un vaso de unicel con N<sub>2</sub>L y después pasados al termo, colocándolos de forma vertical manteniéndose ahí durante aproximadamente 4 meses hasta el momento de la desvitrificación previa a la transferencia.

#### 5.8 Calentamiento o desvitrificación

1.- Una vez extraídos del N<sub>2</sub>L, las pajillas y los capilares fueron expuestos 8 segundos en el aire a temperatura ambiente.

2.- Para descargar el embrión, el envase fue sumergido en una alícuota con 0.5 ml de medio de desvitrificación 1 (0.25 M de sacarosa + 4 ml de PBS) durante 3 minutos a una temperatura de 35°C.

4.- Mientras transcurrieron los 3 minutos, los 0.5 ml del medio de desvitrificación 1 contenido en la alícuota fueron depositados a una caja de Petri de 30 mm de diámetro para localizar el embrión.

5.- Una vez localizado el embrión y transcurridos los 3 minutos, el embrión fue colocado a una gota de medio de desvitrificación 2 (0.15 M de sacarosa + 4 ml de PBS) durante 1 minuto a una temperatura de 35°C.

6.- Después, el embrión fue colocado en una caja de Petri con solución PBS para ser observado en el microscopio estereoscópico y determinar su integridad morfológica y compararla con la determinada previamente.

7.- Finalmente, el embrión se mantuvo en medio de mantenimiento hasta el momento de ser transferido durante un rango de tiempo de 15-20 minutos a temperatura ambiente.

Nota: el medio de desvitrificación 1 se mantuvo en baño María a 35°C y las gotas del medio de desvitrificación 2 se mantuvieron a 35°C mediante el uso de un tapete térmico.

#### 5.9 Transferencia de embriones

A las receptoras se les transfirió un solo embrión, calidad uno o dos, en etapa de blastocisto a los 6.5-7 días post estro utilizando la técnica de laparoscopia previamente descrita, evaluando primeramente la respuesta de la receptora al tratamiento de sincronización al cual fueron sometidas. El embrión fue transferido al lado ipsolateral al ovario que presentó un cuerpo lúteo. El lugar de deposición del embrión fue en el tercio superior del cuerno uterino, es decir, en la parte próxima a la unión útero-tubárica para que este pudiera continuar con su desarrollo en el útero<sup>55</sup>.

## 5.10 Seguimiento

Se realizó el diagnóstico de gestación temprana con no retorno al estro 14 días después de la transferencia y a los 45 días con ultrasonografía de imagen y tiempo real<sup>82</sup>.

## 5.11 Análisis estadístico

El procedimiento estadístico utilizado para determinar el efecto la influencia del tipo de envase sobre la calidad del embrión antes y después de la vitrificación fue el procedimiento CATMOD incluido en el paquete estadístico SAS, versión 1997<sup>83</sup>, el cual permite mediante el análisis de regresión logística, extender las técnicas del análisis de regresión múltiple al estudio de modelos en los que la variable dependiente es discreta<sup>84</sup>.

Los resultados de la comparación entre envases de acuerdo al porcentaje de fertilidad obtenidos en las receptoras fueron analizados utilizando la prueba exacta de Fisher que permite analizar si dos variables están asociadas cuando la muestra a estudiar es pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación del test  $\chi^2$  sea adecuada<sup>85</sup>.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Sincronización de donadoras

De las 10 cabras utilizadas, 9 (90%) mostraron celo entre las 24 a 48 horas después de retirado el CIDR. Una (10%) no mostró celo. Cada donadora recibió en promedio 5 montas de un semental de su misma raza. Se utilizaron dos machos. Hubo una diferencia de presentación de celos de 12 horas. Las donadoras se agruparon en 3 grupos los cuales se trabajaron de manera separada con un intervalo de 2 días de diferencia entre ellos.

### 6.2 Sincronización y manifestación de celo en las receptoras

El número total de receptoras que fueron sincronizadas fue de 90; de estas, 73 (81.1%) mostraron celo con diferencia de 12 a 24 horas en la presentación de celos y fueron transferidas 57 (78%) que presentaron un cuerpo lúteo de buena calidad. Todas las receptoras fueron transferidas el mismo día. En el cuadro 1 se presenta la respuesta de las receptoras al tratamiento de sincronización.

Cuadro 1. Respuesta de las receptoras al tratamiento de sincronización

Total de receptoras	Hembras que mostraron celo		Hembras transferidas	
	N	%	N	%
90	73	81.1	57	78.0

### 6.3 Recolección de embriones

Nueve donadoras que respondieron al tratamiento superovulatorio fueron recolectadas por medio de la técnica de laparotomía medio ventral y de 5 (55.5%) se obtuvieron 100 embriones en total (Anexo 1) (12 mórulas tempranas, 31 mórulas compactas y 57 blastocistos). De los 57 blastocistos recuperados, 28 fueron asignados para su vitrificación en pajilla de 0.25 ml y 29 en tubo capilar (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidad de embriones recuperados, estadio de desarrollo y tipo de envase utilizado para su almacenamiento

Mórulas tempranas	Mórulas compactas	Blastocistos		Total embriones Recuperados	
12	31	57		100	
		Pajilla 0.25 ml	Tubo capilar		
		28	29		

#### 6.4 Evaluación embrionaria (calidad)

De los 57 embriones obtenidos, 28 de calidad 1 en etapa de blastocisto fueron vitrificados y almacenados en pajillas de 0.25 ml, mientras que 29 blastocistos calidad 1 y 2 calidad 2 fueron vitrificados y almacenados y vitrificados en tubos capilares de vidrio de 5 µl (cuadro 3). Una vez que fueron desvitrificados, se hizo una segunda evaluación morfológica antes de realizar la transferencia, y se observó que de los 28 embriones almacenados en pajillas de plástico, 19 embriones (68%) permanecieron calidad 1 y 9 embriones (32%) cambiaron a calidad 2. Así mismo, de los 29 embriones vitrificados en los capilares de vidrio, 23 embriones (79%) permanecieron en calidad 1 y 6 embriones (21%) cambiaron a calidad 2 (cuadro 3), sin que se encontrara un efecto del envase en estos cambios ( $P>0.05$ ).

Cuadro 3. Calidad de los blastocistos envasados en pajillas o capilares *antes y después* de su vitrificación

	Pajilla de plástico		Tubo capilar de vidrio		Totales	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Antes	28 (100%) <sup>a</sup>	0 (0%) <sup>a</sup>	27 (93%) <sup>a</sup>	2 (7%) <sup>a*</sup>	55 (96.5%) <sup>a</sup>	2 (3.5%) <sup>a</sup>
Después	19 (68%) <sup>b</sup>	9 (32%) <sup>b</sup>	23 (79%) <sup>b</sup>	6 (21%) <sup>b</sup>	42 (73.7%) <sup>b</sup>	15 (26.3%) <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Valores con diferente literal en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ). Valores con similar literal en la misma fila no son estadísticamente diferentes ( $P>0.05$ ).

\* A la desvitrificación un embrión calidad 2 almacenado en pajilla de plástico cambió a calidad 3. Para efectos del análisis estadístico se incluyó en los embriones calidad 2.

## 6.5 Diagnóstico de gestación y porcentaje de fertilidad

A partir del día doce al catorce después de la transferencia, se realizó un diagnóstico preliminar de no retorno a estro, obteniéndose un 39.2% (11/28) en el grupo 1 y un 44.8% (13/29) en el grupo 2, el cual fue corroborado a los 45 días de gestación mediante ultrasonografía de imagen encontrándose diferencias porcentuales en cuanto a lo observado con el no retorno a estro. De los 28 embriones vitrificados en pajillas de plástico de 0.25 ml que fueron transferidos a su respectivas receptoras, se obtuvieron 9 gestaciones (32%), mientras que de los 29 embriones vitrificados en tubos capilares de vidrio de 5  $\mu$ l, se obtuvieron 12 gestaciones (41%); en total, el número de hembras gestantes fue de 21 (37%), como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Número de embriones transferidos dependiendo del tipo de envase, número de hembras gestantes y porcentaje de fertilidad obtenido.

Tipo de envase	Número de embriones transferidos	Número de hembras gestantes	% de fertilidad
Pajilla de 0.25 ml	28	9	32 <sup>a</sup>
Tubo capilar	29	12	41 <sup>a</sup>
Totales	57	21	37

<sup>a</sup> Valores con la misma literal no son estadísticamente diferentes ( $P > 0.05$ ).

## VII. DISCUSIÓN

El porcentaje de fertilidad obtenido después de vitrificar embriones caprinos fue del 37%, es decir, que de los 57 embriones transferidos, se obtuvieron 21 gestaciones. Como se mencionó anteriormente, en este estudio se transfirió solamente un embrión por receptora.

El porcentaje de fertilidad obtenido en este trabajo difiere ampliamente con lo reportado por Yuswiati y Holtz<sup>6</sup> en el que se vitrificaron embriones de cabra lográndose una tasa de gestación del 12.5% y con lo reportado por El-Gayar y Holtz<sup>4</sup> donde aplicaron el método OPS en blastocistos de cabra y concluyen que el 100% de las hembras transferidas quedaron gestantes.

Debido a la gran cantidad de variables que se tienen aún en un programa de transferencia de embriones en fresco, éstas son todavía mayores cuando los embriones son manipulados para su criopreservación y desvitrificación. Así, estos resultados son contrastantes y probablemente se deban a la cantidad total de embriones o de receptoras a las cuales fueron transferidos, al número de embriones transferidos por receptora o a la metodología empleada para la vitrificación.

Al Yacoub *et al.*<sup>8</sup> utilizaron el método de vitrificación OPS para criopreservar embriones caprinos y reportaron una tasa de gestación del 82%. De igual forma, Gibbons *et al.*<sup>66</sup> evaluaron la tasa de gestación que se obtiene de blastocistos vitrificados de cabras criollas y reportan una tasa de preñez del 64%. Ambos trabajos reportan porcentajes de fertilidad mayores en comparación con lo reportado en este experimento, por lo que estas diferencias también pueden deberse al tipo de envase utilizado para criopreservar a los embriones ya que en ambos se utilizaron pajillas OPS, a la composición del medio de vitrificación ya que en ambos trabajos el porcentaje de inclusión de los crioprotectores fue diferente<sup>i</sup> y/o a la cantidad de embriones transferidos por

---

<sup>i</sup> <sup>8</sup>: (i) Medio de mantenimiento + 10% etilenglicol + 10% DMSO por 1 min; (ii) 20% etilenglicol + 20% DMSO por menos de 25 seg. <sup>66</sup>: (i) Medio base + 10% glicerol por 5 min; (ii) Medio base + 10% glicerol +

receptora, ya que en los dos trabajos citados anteriormente se transfirieron 2 embriones por hembra receptora y más específicamente, en el estudio de Gibbons *et al.*<sup>66</sup> se transfirieron 2 embriones, uno en etapa de mórula y otro en etapa de blastocisto, lo que impide saber con precisión ¿cuál de los dos embriones produjo la gestación y en qué etapa de desarrollo se encontraba dicho embrión?.

Contrario a esto, en el 2006, Guignot *et al.*<sup>19</sup> diseñaron un método de vitrificación de tres pasos que fuera adecuado para la transferencia de embriones caprinos en condiciones de campo en el cual adicionaron 0.4 M de sacarosa al medio de vitrificación (1.- 10% glicerol por 5 min; 2.- 10% glicerol + 20% etilenglicol por 5 min; 3.- 25% glicerol + 25% etilenglicol + 0.4 M sacarosa por 30 segundos) en asociación con transferencia directa, mejorando significativamente la viabilidad de embriones caprinos vitrificados. Los embriones fueron almacenados en pajillas francesas de plástico de 0.25 ml y reportan una tasa de gestación del 29.3%; siendo este porcentaje similar a lo reportado en este experimento. Aunque una diferencia importante es que, como en estudios previos, se transfirieron 2 embriones por receptora, además de que la composición y el tiempo de exposición a los medios fueron distintos a los usados en este experimento. De igual forma, Chen *et al.*<sup>55</sup> vitrificaron biopsias obtenidas de embriones caprinos y una vez desvitrificadas, se determinó la tasa de desarrollo hasta blastocisto que fue del 47.1% (8/17), y éstos al ser transferidos produjeron una tasa de gestación del 37.5% (3/8), lo que también concuerda con lo encontrado en este trabajo.

La técnica de vitrificación en embriones de cabra ha sido menos utilizada en comparación con otras especies. En ovejas, Green *et al.*<sup>86</sup>, vitrificaron blastocistos con la técnica OPS obteniendo una tasa de gestación de 44.4% (8/18), siendo similar a lo obtenido en este estudio. En el mismo año, Bettencourt *et al.*<sup>87</sup> compararon el uso de vitrificación convencional (es decir, usando pajillas 0.25 ml) con el uso de vitrificación OPS en embriones ovinos en

---

20% etilenglicol por 5 min, y solución de vitrificación; (iii) Medio base + 25% glicerol + 25% etilenglicol por 30 seg y solución de vitrificación.

etapa de blastocisto y concluyen que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas en cuanto a la tasa de gestación registrada (50% y 54.6%, respectivamente). En bovinos, Lopatarova *et al.*<sup>88</sup> estudiaron el efecto que tiene el proceso de vitrificación usando la técnica OPS sobre la tasa de gestación después de la transferencia de embriones producidos *in vivo* obteniendo una tasa de gestación de 55.1% (16/30) con blastocistos de calidad 1 siendo mayor a lo encontrado en este trabajo, lo cual puede deberse a la composición del medio usado para la vitrificación en dos pasos (1.- 7.5% etilenglicol + 7.5% DMSO por 3 minutos. 2.- 16.5% etilenglicol + 16.5% DMSO + 0.5 M sacarosa por 25 segundos). Block *et al.*<sup>89</sup> vitrificaron blastocistos con la técnica OPS y obtuvieron una tasa de gestación del 29.5% (23/78), lo que concuerda con lo reportado en este trabajo.

Una variable importante a considerar en este estudio es la calidad del embrión antes y después de ser vitrificado, ya que uno de los objetivos era determinar si esta técnica de criopreservación, provocaba cambios morfológicos considerables en el embrión caprino, que pudieran comprometer su desarrollo post-desvitrificación.

En el presente trabajo la selección de los embriones para ser vitrificados antes de ser transferidos se realizó con base a la observación estereomicroscópica, y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la calidad de los embriones antes y después de ser vitrificados, independientemente del tipo de envase utilizado para el almacenaje. El 73.7% (42/57) permaneció en C1 y el 26.3% (15/57) cambió a C2, siendo que en la evaluación previa solo el 3.5% (2/57) eran C2. Esto concuerda con otros estudios que han demostrado que existen ciertas anomalías que permanecen indetectables al microscopio estereoscópico y que se hacen evidentes al evaluarlos con microscopía electrónica o a través de la prueba TUNEL<sup>90-93</sup>.

Jiménez<sup>93</sup> realizó un estudio para comparar el daño en embriones ovinos congelados lentamente o vitrificados utilizando la prueba de TUNEL y

concluyen que la congelación lenta constituye una fuente de estrés lo suficientemente importante para aumentar significativamente el índice de muerte celular (DCI, por sus siglas en inglés), no así la vitrificación, procedimiento que aunque infringe daños por muerte celular programada (MCD, por sus siglas en inglés) en el embrión, estos no difieren en gran medida del testigo en fresco. De manera que la vitrificación es un proceso más compatible con la supervivencia embrionaria, porque el margen de daño aparentemente puede ser subsanado por las células sobrevivientes. Es importante señalar que en el presente trabajo, al realizar la evaluación de los embriones después de ser desvitrificados no se descartaron embriones, ya que ninguno cambio a una calidad no transferible.

Vajta *et al.*<sup>94</sup> realizaron un estudio con blastocistos bovinos en el cual compararon la evaluación morfológica después de la vitrificación, usando microscopía estereoscópica o electrónica, encontrando que a las 0 h después de desvitrificar los embriones, excepto por un rápido colapso del blastocele, únicamente cambios menores fueron detectables con la microscopía estereoscópica. Sin embargo, a nivel ultraestructural la microscopía electrónica permitió identificar signos graves de lesiones tales como ruptura de la zona pelúcida, distensión o contracción de la mitocondria, desintegración de las uniones celulares entre las células trofoblásticas adyacentes y completa ruptura de algunas células<sup>90, 95</sup>.

Por otro lado, Bettencourt *et al.*<sup>92</sup> usaron blastocistos ovinos para estudiar las alteraciones ultraestructurales inducidas por la vitrificación OPS y reportaron que el 100% de los embriones clasificados C1 previamente con microscopía estereoscópica cambiaron a C2, lo que difiere ampliamente con lo reportado en el presente trabajo en el cual, sólo el 26.3% de los embriones vitrificados demeritaron su calidad a C2. En el mismo trabajo, se reportó que el 33.3% de los embriones clasificados C1 con microscopía óptica cambiaron a C2, mientras que el 66.6% cambiaron a C3.

Esto también difiere con lo encontrado en este estudio, ya que sólo un embrión C2 cambió a C3. Estas diferencias pueden deberse a que en el presente estudio no se realizaron estudios con microscopía óptica por lo que no se pudo determinar hasta qué grado los embriones C2 demeritaron su calidad. De la misma manera, las diferencias pueden deberse al tipo de envase utilizado para criopreservar a los embriones, ya que se almacenaron todos los embriones en pajillas OPS de plástico y en este estudio, 28 embriones se almacenaron en pajillas de plástico de 0.25 ml y 29 embriones en tubos capilares de vidrio de 5  $\mu$ l.

Una variable a considerar en la técnica de vitrificación, es el material con el que está fabricado el envase donde serán almacenados los embriones. En el presente trabajo se compararon dos envases, pajillas de plástico de 0.25 ml o tubos capilares de vidrio de 5  $\mu$ l, obteniéndose un porcentaje de fertilidad del 32.14% y del 41.37%, respectivamente en las receptoras a los cuales fueron transferidos, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas.

Ríos *et al.*<sup>9</sup> estudiaron el efecto del material del envase usado para vitrificar embriones bovinos, sin que encontraran diferencias en cuanto a las tasas de eclosión después de 72 h de cultivo *in vitro*, de embriones envasados en pajillas de plástico o en capilares de vidrio, resultados parecidos a los obtenidos en el presente trabajo, esto a pesar de que el tipo y la concentración del crioprotector utilizado fueron diferentes.

Hasta el día de hoy, no existe un protocolo estandarizado de vitrificación para todas las especies y para diferentes etapas embrionarias, ya que existe una variabilidad inter e intra especies (tales como la criotolerancia, la etapa de desarrollo en la que se realice la vitrificación, la respuesta a la exposición a los medios de vitrificación), lo que ha dificultado que exista un protocolo común que pueda ser aplicado a embriones de diferentes especies o incluso a embriones de una misma especie en distintas etapas de desarrollo<sup>66</sup>.

La etapa de desarrollo embrionaria es considerada como un factor importante relacionado con la viabilidad de los embriones después de la criopreservación<sup>60</sup>. La tasa de sobrevivencia embrionaria generalmente aumenta con etapas de desarrollo más avanzadas, de mórula compacta a blastocisto expandido<sup>57, 59</sup>. La diferencia en la sobrevivencia de blastocistos y mórulas de cabra se le puede atribuir a la variación en la sensibilidad a los agentes crioprotectores o a los procedimientos de vitrificación y a la determinación de una concentración óptima del crioprotector utilizado<sup>66</sup>. Las tasas de permeabilidad y toxicidad podrían así estar relacionadas a la especie y a la etapa de desarrollo del embrión<sup>30</sup>. Actualmente, existen estudios que evidencian el hecho de que en el caso de los caprinos, no es conveniente vitrificar mórulas<sup>8, 66</sup> a diferencia de la vitrificación de blastocistos. Las diferencias entre etapas podrían explicarse por las diferencias en las tasas de penetración asociadas con los crioprotectores en etapas tempranas de desarrollo embrionario<sup>96</sup>.

Sin embargo, en el trabajo de Gibbons<sup>66</sup> no se encontraron diferencias significativas en la tasa de gestación o en la tasa de sobrevivencia embrionaria de acuerdo a la etapa de los embriones vitrificados. Esto también concuerda con Baril *et al.*<sup>97</sup> en ovejas y Lopatarova *et al.*<sup>88</sup> en bovinos.

En cabras, Hong *et al.*<sup>39</sup> reportó resultados similares después de la transferencia de embriones criopreservados con el método de congelación convencional (46%) o con la vitrificación OPS (51.4%).

Gibbons *et al.*<sup>66</sup> también reporta que la tasa de sobrevivencia embrionaria en cabras (64%) fue mayor que los resultados obtenidos después de la congelación lenta usando etilenglicol en un programa de transferencia convencional (45-53%)<sup>19, 97</sup>.

## VIII. CONCLUSIONES

Las diferencias en la tasa de sobrevivencia de mórulas entre ovinos y caprinos, indican que se necesitan más estudios para intentar reducir el daño en las células de la mórula de cabra. La técnica más ampliamente usada para la criopreservación de embriones de cabra y oveja es la técnica de congelación lenta. Sin embargo, el método de vitrificación desarrollado en este estudio permite una fácil manipulación de los embriones antes de la vitrificación en N<sub>2</sub>L, también para la desvitrificación y los procedimientos de rehidratación. Además, la composición de los medios utilizados para la vitrificación y desvitrificación aquí propuesta resultó ser eficiente proporcionando porcentajes de gestación aceptables. El uso de tubos capilares de vidrio de 5 µl para vitrificar embriones de cabra proporcionó tasas de gestación similares a las obtenidas con pajillas de plástico de 0.25 ml; sin embargo, ofrecen la ventaja de usar un volumen de medio de vitrificación más pequeño evitando así que el embrión esté en contacto con una mayor cantidad de sustancias tóxicas como son los crioprotectores. Se concluye que la técnica de vitrificación de embriones caprinos utilizada en el presente trabajo es eficiente, de bajo costo y fácil de aplicar en condiciones de campo, ya sea empleando pajillas de plástico de 0.25 ml o capilares de vidrio de 5 µl.

## IX. LITERATURA CITADA

1. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;65:236-244.
2. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987;24:387-402.
3. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;60-61:357-364.
4. El-Gayar M, Holtz W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J Anim Sci* 2001;79:2436-2438.
5. Bilton RJ, Moore NW. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *J Biol Sci* 1976;9:125-9.
6. Yuswiati E, Holtz W. Successful transfer of vitrified goat embryos. *Theriogenology* 1990;34:629-632.
7. Arav A, Yabin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cel Endoc* 2002;187:77-81.
8. Al Yacoub AN, Gaulu M, Holtz W. Open pull straw vitrification of goat embryos at various stages of development. *Theriogenology* 2010;73:1018-1023.
9. Ríos GL, Mucci NC, Kaiser CG, Alberio RH. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2010;118:19-24.
10. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol of Rep* 1996;54:1059-1069.
11. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998;51:53-58.
12. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility* 1999;72:1073-1078.
13. Kong IK, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS. Comparison of Open Pulled Straw (OPS) vs Glass Micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology* 2000;53:1817-1826.
14. Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of a large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 2001;42:139-144.
15. Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS, Kong IK. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Rep Sci* 2002;73:151-158.
16. Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Da Silva JT, Barros A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Rep* 2004;19:300-305.
17. He X, Park EYH, Fowler A, Yarmush ML, Toner MT. Vitrification by ultra-fast cooling at low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-

- capillary: A study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology* 2008;56:223-232.
18. Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 2003;59:1839-1850.
  19. Guignot F, Bouttier A, Baril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers JF, *et al.*, Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology* 2006;66:1004-1011.
  20. Kasai M. Vitrification: Refined strategy of the cryopreservation of mammalian embryos. *J. Mamm Ova Res* 1997;14:17-28.
  21. Martínez AG, Matkovic M. Cryopreservation of ovine embryos: Slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 1998;49:1039-1049.
  22. Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 2002;57:285-302.
  23. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003;59:171-188.
  24. Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Brienza V, Seidel Jr. GE, Squires EL, Carnevale EM. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* 2005;63:1308-1319.
  25. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  y  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science* 1972;178:411-414.
  26. Shirazi A, Soleimani M, Karimi M, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B. Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology* 2010;60:204-210.
  27. Dattena M, Accardo C, Pilichi S, Isachenko V, Mara L, Chessa B, *et al.*, Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology* 2004;62:481-493.
  28. Dobrinsky JR Cellular approach to the cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996;45:17-26
  29. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai Y, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990;89:91-97-
  30. Bautista JAN, Kanagawa H. Current status of vitrification of embryo and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Jpn J Vet Res* 1998; 45(4):183-191.
  31. Cabodevila J, Teruel M. Biotecnología de la reproducción. Criopreservación de embriones bovinos. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 2001. pp-149-174.
  32. Mucci N, Aller J, Cabodevila J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio RH. Criopreservación de embriones bovinos. *Taurus Bs As* 2007;7(26):20-35.
  33. Arav A, Shehu D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1993;99:353-358.
  34. Tachikawa S, Otoi T, Kondo T, Machida T, Kasai M. Successful vitrification of bovine blastocysts derived by in vitro maturation and fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993;34:266-271.

35. Le Gal F, Baril G, Vallet JC, Leboeuf B. In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology* 1993;40:771-777.
36. Puls-Kleingeld M, Nowshari MA, Holtz W. Cryopreservation of goat embryos by the one-step or three-step equilibration procedure. In: *Recent Advances in Goat Production*. R. R. Lokeshwar (ed.) Nutan Printers, New Delhi 1992;1388-91.
37. Nowshari MA, Holtz W. In vitro culture of goat morulae to blastocysts before freezing. *Theriogenology* 1995;44:983-8.
38. Baril G, Brebion P, Chesné P. Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal. 1995. Vol. 83 pp. 91-100.
39. Hong QH, Tian SJ, Zhu SE, Feng JZ, Yan CL, Zhao XM, *et al.*, Vitrication of Boer goat morulae and early blastocysts by straw and Open-Pulled Straw method. *Reprod Dom Anim* 2007;42:34-38.
40. Campos-Chillón LF, Walker DJ, De la Torre-Sánchez JF, Seidel GE. In vitro assessment of a direct transfer vitrication procedure for bovine embryos. *Theriogenology* 2006;65:1200-1214.
41. Albarracín JL. Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. PhD Thesis. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
42. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrication. *Nature* 1985;313:573-575.
43. Liu WX, Luo MJ, Huang P, Yue LM, Wang L, Zhao CY, *et al.*, Comparative study between slow freezing and vitrication of mouse embryos using different cryoprotectants. *Reprod Dom Anim* 2009;44:788-791.
44. Graves-Herring JE, Boone WR. Blastocyst rate and live births from vitrication and slow-cooled two cell mouse embryos. *Fertility and Sterility* 2009;91-3:920-924.
45. Fahy GM. Vitrication: a new approach to organ cryopreservation. *Prog Clin Biol Res* 1986;224:305-335.
46. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrication solutions. *Theriogenology* 2007;67:81-89.
47. Okada A, Yoshii K, Mizuochi Y, Andoh T, Joujou S, Wachi S, *et al.*, Viability of cryopreserved and vitricated embryos and fertility after direct transfer in ewes. *J Reprod Dev* 2002;48:189-195.
48. Michelmann H W, Nayudu P. Cryopreservation of human embryos. *Cell Tissue Bank* 2006;7:135-141.
49. Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biot Adv* 1996;14:127-149.
50. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. Successful vitrication of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters* 1997a;18:191-195.
51. Niasari-Naslaji A, Hansen PJ, Moore K, Thatcher WW. Successful cryopreservation of in vitro derived bovine blastocysts in microcapillary pipette tips. *Iran Jour of Vet Res* 2007;8.

52. Rodríguez P, Ongaratto F, Scherer D, De Ávila B, Rodríguez JL. Survival of vitrified mouse blastocysts loaded into glass microcapillaries. *Rev Colomb Cienc Pec* 2010;23:28-34.
53. Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo letter*, 1987;7:270-273.
54. Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 1999;51:175. [Abstr]
55. Chen A, Zhang R, Yu S. Comparative results of survival of vitrified biopsied goat embryos and mouse morulae. *Turk J Vet Anim Sci* 2008;32(2):93-97.
56. [Romo S, Duclomb YC, Alvarez AL, González F. Guía fotográfica para la evaluación de embriones bovinos. XXXII Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Ver. Pp. 468-473. 2008.](#)
57. Szell AZ, Windsor DP. Survival of vitrified sheep embryos in vitro and in vivo. *Theriogenology* 1994;42:881-889.
58. Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* 2001;36:49-55.
59. García-García RM, González-Bulnes A, Domínguez V, Veiga-López A, Cocero MJ. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. *Cryobiology* 2006;52:108-113.
60. Cocero MJ, Sebastian AL, Barragan ML, Picazo RA. Differences in post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology* 1996;33:502-507.
61. Garcia-Lopez M. Efecto del sistema de crioprotección sobre el índice de desarrollo in vitro de embriones ovinos congelados en distintos estadios, Ph.D. Thesis, University Complutense of Madrid, 2001. Published by Tesis Doctorales INIA, Serie Ganadera no. 5 (2001).
62. Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:43-53.
63. Mohr LR, Trounson AO. Structural changes associated with freezing of bovine embryos, *Biol. Reprod.* 1981;25:1009-1025.
64. Heyman Y, Vincent C, Chesne P. Congélation des embryons de mammifères à différents stades de développement, *Contraception, Fertilité, Sexualité* 1987;15:579-584.
65. Li R, Cameron WN, Batt PA, Trounson AO. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod Fert Dev* 1990;2:345-50.
66. Gibbons A, Cueto MI, Pereyra BF. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Rum Res* 2011;95:61-64.
67. Huang JC, Lin HH, Tang PH, Liu BT. Vitrification of caprine embryos in microdrops. *Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Taiwan, 2006*;47-58.
68. Udy GB. Commercial splitting of goat embryos. *Theriogenology* 1987;28:837-47.

69. Nowshari MA, Holtz W. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. *J Anim Sci* 1993;71:3403–8.
70. Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos, *Theriogenology* 1984;21:68–79.
71. Szell AZ, Shelton JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert* 1986;78:699–703.
72. Ziomeck CA, Johnson MH. Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* 1980;935–942.
73. Mazur P, Rigopoulos N, Jackowsky SC, Leibo SP. Preliminary estimates of permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. *Biophys. J.* 1976;16:232.
74. Shimada MA. *Nutrición Animal*. México: Trillas, 2004.
75. Domingo E, Abad A, Lanari MR, Raiman R. Composición corporal de cabras criollas neuquinas en distintas notas de condición corporal. *Arch Zootec* 2009; 58:125-127.
76. González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, García-García RM, Cocero MJ, López-Sebastián. Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes. *Invest Agr.: Prod. Sanid. Anim* 2002;17:1-2.
77. Regueiro M, Pérez Clariget R, Ganzábal A, Aba M, Fosberg M. Effect of medroxyprogesterone acetate and eCG treatment on the reproductive performance of dairy goats. *Small Ruminant Res.* 1999;33:223–230.
78. Sumano LH, Ocampo CL. *Farmacología veterinaria*. México: McGraw-Hill, 1997.
79. Hernández IJ. Efecto del estado folicular sobre la respuesta superovulatoria, grado de desarrollo y calidad embrionaria en ovejas pelibuey (tesis de maestría). Colima (Colima) México: Univ de Colima, 2009.
80. Seidel GE, Walker DJ. Pregnancy rate with embryos vitrified in 0.25 ml straws. *J. Reprod. Dev.* 2006;52 suppl:71-76.
81. *Manual de Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos*. INTA Baicare. Buenos Aires Argentina 2003: 70-72.
82. Medan M, Watanabe G, Absy G, Sasaki K, Sharawy S, Taya K. Early pregnancy diagnosis by means of ultrasonography as a method of improving reproductive efficiency in goats. *J Reprod Dev* 2004; 50:391-397.
83. SAS. *Statistical Analysis System. In: SAS/STAT™ User's guide. Release 6.03*. Cary, NC, SAS Institute Inc., 1988:15-21
84. Silva B, Cañón J. Análisis de variables categóricas mediante el procedimiento CATMOD de SAS®: aplicación a datos de cruzamiento industrial en bovino. Depto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid.
85. Cody RP, Smith JK. *Applied statistics and the SAS programming language*. 4<sup>th</sup> ed. USA: Prentice-Hall, Inc. 1997.
86. Green RE, Santos BFS, Shiclerle CC, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Repro Dom Anim* 2009;44:406-410.

87. Bettencourt EMV, Bettencourt CM, Silva JCE, Ferreira, De Matos PC, Romão RJ, *et al.*, Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. *Small Rum Res* 2009a;82:112-116.
88. Lopatarova M, Cech S, Holy L, Dolezel R. The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of in vivo produced bovine embryos. *Veterinarni Medicina* 2006 (9);51:454-460.
89. Block J, Bonilla L, Hansen PJ. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology* 2009;71:1063-1071.
90. Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocysts production. *Mol Repr and Dev* 2001;58:186-195.
91. Coutinho ARS, Mendes CM, Caetano HVA, Nascimento AB, Oliveira VP, Hernández-Blazquez FJ, *et al.*, Morphological changes in mouse embryos cryopreserved by different techniques. *Microsc Res and Tech* 2007;70:296-301.
92. Bettencourt EMV, Bettencourt CM, Silva JNCE, Ferreira P, De Matos CP, Oliveira E, *et al.*, Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology* 2009b;71:947-958.
93. Jiménez AO. Comparación del daño en embriones ovinos congelados lentamente o vitrificados y su posible efecto en la supervivencia embrionaria (tesis de maestría) México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
94. Vajta G, Hyttel P, Callesen H. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Mol Reprod Dev* 1997b;48:9-17
95. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biol of Repr* 2001;65:1127-1134.
96. Szell AZ, Shelton JN, Szell K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Criobiology* 1989;26:297-301.
97. Baril G, Traldi AS, Cognié Y, Leboeuf B, Beckers JF, Mermillod P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 2001;56:299-305.

## Anexo

ID donadora	Envase	Número de embriones	Calidad	Estadío
9216	Capilar	4	1	5
	Pajilla	3	1	5
	Pajilla	2	1	5
	Pajilla	5	1	4
9203	Pajilla	3	1	6
		2	1	5
	Capilar	3	1	6
		2	1	5
	Capilar	2	1	4
		1	2	4
9219	Capilar	3	1	6
		2	1	5
		1	2	5
	Pajilla	1	1	6
		4	1	5
	Pajilla	18	1 y 2	4
	Capilar	12	-	3
	9225	Capilar	1	2
4			1	6
Pajilla		1	1	7
		4	1	6
Pajilla		4	1	6
		2	1	5
Capilar		4	1	6
		3	1	5
Capilar		5	1	4
6989		Pajilla	2	1
	Capilar	2	1	5
Total de embriones		100		
Total de blastocistos		57		

Claves	
3	Mórula temprana
4	Mórula compacta
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido