

1-1-2013

Efecto de las técnicas de congelación lenta y vitrificación con etilenglicol sobre la calidad poscriopreservación de embriones bovinos producidos in vitro

José Nevardo Vargas Reyes
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias

Citación recomendada

Vargas Reyes, J. N. (2013). Efecto de las técnicas de congelación lenta y vitrificación con etilenglicol sobre la calidad poscriopreservación de embriones bovinos producidos in vitro. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/10

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

.UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE LAS TÉCNICAS DE CONGELACIÓN LENTA Y VITRIFICACIÓN CON
ETILENGLICOL SOBRE LA CALIDAD POSCRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES
BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

JOSE NEVARDO VARGAS REYES

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:

Magister en Ciencias Veterinarias

Bogotá. Colombia

2013

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE LAS TÉCNICAS DE CONGELACIÓN LENTA Y VITRIFICACIÓN CON
ETILENGLICOL SOBRE LA CALIDAD POSCRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES
BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

Trabajo de Grado

JOSE NEVARDO VARGAS REYES

76111206

Directora:

Liliana Chacón M.V., M.Sc., Ph.D.

Bogotá, Colombia

2013

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Rector	Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo
Vicerrector Académico	Hno. Fabio Coronado Padilla
Vicerrector De Investigación Y Transferencia	Hno. Luis Fernando Ramirez
Vicerrector De Promoción y Desarrollo Humano	Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero
Vicerrector Administrativo	Dr. Eduardo Ángel Reyes
Decano Facultad de Ciencias Agropecuarias	Dra. Claudia Aixa Mutis Barreto
Secretario Académico	Dr. Alejandro Tobón González
Director De Posgrados	Dr. Germán Rodríguez Martínez

COMPROMISO

Los trabajos de grado no contienen ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a Dios, por permitir la culminación de otra etapa en mi vida y haberme dado salud para poder lograr mis objetivos.

A mis padres, por apoyarme en todo momento. Por los consejos, los valores, la motivación constante para ser un hombre de bien y por el valor infundido para siempre salir adelante.

A mi directora, Doctora Liliana Chacón por el apoyo ofrecido para la elaboración de este trabajo de grado. Quien con sus conocimientos y dedicación siempre ha estado dispuesta a ayudarme.

Al personal del laboratorio Vitrogen por la logística y en especial a la Doctora Beatriz Bernal por la disposición en la enseñanza de los procesos de laboratorio necesarios para este proyecto

Al Doctor César Díaz y demás planta de docentes de la maestría que me ayudaron con asesorías y dudas presentadas en la elaboración del trabajo de grado.

A mis compañeros y amigos de la maestría por todas las sugerencias y apoyo durante nuestros estudios.

RESUMEN

Aunque se han logrado congelar y descongelar embriones producidos *in vitro*, en estado de preimplantación y luego obtener nacimientos, en la actualidad no se alcanza un nivel alto de introducción de técnica de criopreservación de embriones *in vitro* en la ganadería bovina. El objetivo de este estudio fue comparar la calidad embrionaria y la tasa de sobrevivencia de embriones bovinos producidos *in vitro* y criopreservados mediante la congelación lenta y vitrificación. Los embriones bovinos producidos *in vitro* a partir de ovarios de matadero se distribuyeron aleatoriamente entre congelación lenta (CI; 1,5 M de Etilenglicol) y dos protocolos de vitrificación: Soluciones vitrificantes comerciales V1 (Achilles Genetics, composición no descrita) y soluciones vitrificantes preparadas en el laboratorio V2. Los embriones en el protocolo V2 fueron expuestos a Etilenglicol (EG) 10 % y DMSO 10 % durante 5 min y luego a Etilenglicol 20% y DMSO 20% por 30 segundos. Posterior a la descongelación y calentamiento se evaluó la tasa de expansión y eclosión de los embriones. La tasa de expansión a las 24 horas presentó diferencias significativas ($P < 0,05$), donde la V1 y V2 presentaron mayor expansión comparadas con la congelación lenta (89% y 86%; 73,6%, respectivamente). La tasa de eclosión a las 24 h fue similar entre los protocolos V1 y V2 (48,4% y 36,2%) y superiores a CI (21,5%; $P < 0,05$). La tasa de eclosión embrionaria a las 48 horas fue similar para CI y V2 (30,7% y 41,1%) y la menor tasa para V1 (9,5%). A las 72 horas se presentaron las menores tasas de eclosión y similares entre los protocolos. En conclusión el protocolo de vitrificación V2 con el cual se prepararon las soluciones vitrificantes en el laboratorio generó la mayor tasa de eclosión embrionaria (84,3%).

Palabras claves: Expansión, eclosión, vitrificación

ABSTRACT

Although there have been frozen and thawed *in vitro* produced embryos, preimplantation state and then get births, currently is not reached a high level of introduction of cryopreservation of embryos in cattle. The aim of this study was to compare embryo quality and survival rates of bovine embryos produced *in vitro* and cryopreserved by slow freezing and vitrification. The bovine embryos produced *in vitro* starting from abattoir ovaries were randomized between slow freezing (CI, 1,5 M ethylene glycol) and two vitrification protocols: commercial vitrification solutions V1 (Achilles Genetics undescribed composition) and vitrification solutions prepared in laboratory V2. Embryos at the V2 protocol were exposed to ethylene glycol (EG) 10% DMSO and 10% for 5 min, 20% ethylene glycol and 20% DMSO for 30 seconds. After thawing and warming was evaluated expansion and hatching rate of embryos. The growth rate at 24 hours showed significant differences ($P<0,05$) where V1 and V2 showed higher expansion compared with slow freezing (89% and 86%, 73,6%, respectively). The hatching rate at 24 h was similar between V1 and V2 protocols (48,4% and 36,2%) and greater than CI (21,5%, $P<0,05$). The embryonic hatching rate at 48 hours were similar to CI and V2 (30,7% and 41,1%) and the lowest rate for V1 (9,5%). At 72 hours showed the lowest rates of hatching and similar between protocols. In conclusion V2 vitrification protocol with which vitrification solutions were prepared in the laboratory generated most embryo hatching rate (84,3%).

Keywords: Blastocyst, Expansion, Hatching, Vitrification

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objeto General	4
1.1.2 Objetivos Específicos	4
1.2 Hipótesis General del Proyecto	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Técnica de Vitricación de Embriones	6
2.2 Comparación de las Técnicas de Vitricación y Congelación Lenta	9
2.3 Técnicas y Resultados Utilizando Protocolos de Vitricación	10
3. METODOLOGÍA	14
3.1 Ubicación Geográfica	14
3.2 Población y Muestra	14
3.3 Métodos y Procedimientos	14
3.3.1 Producción In Vitro de Embriones Bovinos	15
3.3.2 Congelación y Descongelación	16
3.3.3 Vitricación y Calentamiento	17
3.3.4 Vitricación y Calentamiento con Kit comercial Achilles	20
Genetics - Vitrogen	
3.3.4.1 Protocolo de Vitricación Utilizando un Medio Preparado en el Laboratorio	21
3.3.5 Poscriopreservación y Tasa de Supervivencia	21

3.4 Diseño y Análisis Estadístico	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Estandarización de las Técnicas de Vitrificación y Calentamiento	22
4.2 Tasa de Expansión	25
4.3 Tasa de Eclosión	26
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES	32
7. LISTA DE REFERENCIAS	33
8. ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Protocolos, concentración, tiempos y resultados de vitrificación de embriones bovinos producidos In Vitro _____ 12

Tabla 2. Efecto del método de criopreservación de embriones producidos in vitro sobre el porcentaje de expansión a las 24 horas y el porcentaje de eclosión total, evaluadas mediante cultivo in vitro posterior al calentamiento. _____ 25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cava de icopor con NL2 utilizada para mantener el bloque de vitrificación. _____ 17
- Figura 2. Elementos utilizados durante el proceso de vitrificación. (a) Ganchos de vitrificación; (b) Caja de Petri con gotas de soluciones vitrificantes; (c) Embriones bovinos producidos in vitro en solución vitrificante; (d) Transferencia de embriones en el gancho de vitrificación; (e) Bloque de vitrificación WTA; (f) Solidificación de la solución vitrificante; (g) Transferencia de la gota vitrificada a la pajilla. Imágenes d, f, g Tomadas CryoLogic, (CVM Kit, 2008). _____ 19
- Figura 3. Calentamiento de embriones bovinos producidos in vitro. (a) Desembalaje del gancho de vitrificación; (b) Traslado de los embriones desde el gancho a la solución de calentamiento. _____ 20
- Figura 4. Sistema de microgotas empleado para los procesos de vitrificación. _____ 23
- Figura 5. Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro. (a) Embriones en medio de vitrificación 1. (b) Embriones en medio de vitrificación 2. _____ 23
- Figura 6. Embriones en Medio de cultivo. (a) Placas de cultivo. (b) Embriones en medio de cultivo a las cero horas. (c, d) Embriones en medio de cultivo 24 – 48 horas _____ 24
- Figura 7. Efecto de los métodos de criopreservación sobre la tasa de expansión de mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos fueron observados luego del calentamiento. Literales a, b dentro un intervalo de tiempo corresponde a la diferencia entre métodos ($P < 0,05$). _____ 26

Figura 8. Efecto de los métodos de criopreservación sobre la tasa de eclosión.

Mórulas, Blastocistos tempranos y Blastocistos fueron evaluados luego del calentamiento hasta las 72 h. Los literales a y b dentro un intervalo de tiempo corresponde a la diferencia entre métodos ($P < 0,05$)._____ 27

LISTA DE SIGLAS

Sigla	Inglés	Español
BSA	Bovine Serum Albumin	Albúmina sérica bovina
CCO	Cumulus – Oocyte Complexes	Complejo cúmulo oocito
CI	Slow Freezing	Congelación Lenta
CP	Cryoprotector	Crioprotector(es)
EG	Ethylene glycol	Etilenglicol
IVP	<i>In Vitro</i> production	Producción <i>in vitro</i>
NL ₂	Nitrogen Liquid	Nitrógeno líquido
OPS	Open Pulled Straw	Pajilla Abierta y Estirada
PBS	Phosphate – buffered saline	Solución buffer fosfato
SE		Solución de equilibrio
SFB	Fetal Bovine Serum	Suero fetal bovino
SV		Solución de vitrificación
TCM	Tissue CultureMedium	Medio de cultivo tisular
WTA		Watanabe Tecnología

aplicada

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Salida de datos estadísticos	43
Anexo B. Protocolo comercial de vitrificación Achilles Genetics- Vitrogen	51

1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones bovinos facilita la difusión a gran escala de animales genéticamente superiores. Sin embargo, los embriones bovinos producidos *in vitro* todavía difieren de sus homólogos producidos *in vivo*. Estas diferencias incluyen no sólo cambios en la morfología, el color, la densidad, el número total de células, su capacidad de supervivencia sino también se han demostrado diferencias en la abundancia relativa de la transcripción de genes importantes para su desarrollo (Wrenzycki, Herrmann, & Niemann, 2007) y viabilidad (Schmidt et al., 1996). A su vez, es una herramienta para la conservación (Paul, 2007) y en la mayoría de las especies de animales es un desafío, debido a que el embrión puede ser dañado por la exposición a temperaturas por debajo de cero grados (Massip & Donnay, 2003). No obstante, desde los primeros años de la década de 1980, se introdujeron las condiciones de maduración, fertilización y cultivo, para su posterior desarrollo embrionario, aún estos embriones no se producen con la misma calidad biológica que tienen los embriones producidos *in vivo* o por monta natural (Vajta, 2000).

Debido a sus características biológicas específicas, se han utilizado diversas estrategias para minimizar las lesiones celulares tras la criopreservación y poscriopreservación de embriones (Coticchio, Bonu, Borini, & Flamigni, 2004). Así desde que Wilmut y Rowson, 1973 reportaron el primer becerro nacido de un

embrión congelado, las investigaciones se centraron en los efectos de los crioprotectores (CP), el efecto de las bajas temperaturas y la supervivencia posdescongelación (Tripodi, Sturlese, & Cremonesi, 2001). La pérdida de la integridad estructural y/o funcional (Hotamisligil, Toner, & Powers, 1996), indican que los ovocitos y embriones son particularmente sensibles a las condiciones no fisiológicas de temperatura.

El método convencional de congelación lenta ha sido ampliamente utilizado para la criopreservación de embriones producidos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, este método requiere de equipos especiales y protocolos tediosos en sus procedimientos (Naik et al., 2005; Yu et al., 2010). Como técnica esto hace que la vitrificación sea una alternativa a la congelación lenta, además que hay ciertas ventajas como la no formación de cristales de hielo (Arav, Lauria, & Gandolfi, 1992; Rall, Reid, & Polge, 1984; Yavin & Arav, 2007; Yu, et al., 2010). Para evitar confusiones, el término de la vitrificación en criobiología y la embriología se refiere a los métodos en que toda la solución que contiene la muestra biológica vitrifica completamente (Vajta, 2000).

Las comparaciones en cuanto a la calidad luego de la criopreservación entre un enfriamiento lento y la vitrificación principalmente se han elaborado a nivel morfológico, analizando el número total de células (Mucci et al., 2006), la reexpansión y las tasas de eclosión (Nedembale et al., 2004), así como los efectos de la criopreservación sobre el metabolismo embrionario, es decir, la captación de glucosa, piruvato y oxígeno (Stinshoff, Wilkening, Hanstedt, Brüning, & Wrenzycki, 2011).

En 1988, la supervivencia del embrión *in vitro* después de la vitrificación estaba en el 20%(Bielanski & Hare, 1988). En el año 2004, el 80% de los embriones sobrevivientes expandidos y eclosionados fueron observados 24 horas después del calentamiento(Nedambale et al., 2004). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los datos suministrados hasta el momento no son suficientes y que es necesario seguir evaluando estas técnicas(Nedambale, Du, Yang, & Tian, 2006).

Debido a la menor calidad de los embriones producidos *in vitro* y su mayor sensibilidad a los procesos de criopreservación, en Colombia la mayoría de los embriones producidos *in vitro* se transfieren directamente (en fresco) a las receptoras, logrando tasas de preñez con las cuales se puede sostener un laboratorio comercial (Vitrogen, Colombia). El desarrollo y perfeccionamiento de técnicas de criopreservación ya existentes permitirán la optimización de las mismas, la adaptación e implementación en el entorno colombiano, aumentar el porcentaje de supervivencia poscriopreservación y así mismo mayores tasas de preñez lograrán que la producción de embriones *in vitro* ofrezca una mayor ventaja comercial y de conservación de genética embrionaria.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Comparar la calidad embrionaria y tasa de sobrevivencia en embriones bovinos producidos in vitro y criopreservados mediante la congelación lenta y la vitrificación.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar las técnicas de vitrificación y calentamiento de embriones bovinos producidos in vitro.
- Describir los efectos de la congelación lenta / descongelación, vitrificación / calentamiento utilizando el crioprotector etilenglicol sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro.

1.2 Hipótesis General del Proyecto

Con la técnica de criopreservación de embriones por vitrificación se logra obtener mayores tasas de expansión y eclosión comparadas con la congelación lenta.

2. MARCO TEÓRICO

Los crioprotectores (CP) fundamentan los procedimientos de criopreservación, cuando penetran en las células indican la salida de agua a través de la membrana celular. Este proceso depende de la composición de la membrana (Leibo, 2008), que influyen sobre las características de la permeabilidad en dependencia de la temperatura del agua, de los CP y la proporción superficie de volumen (Mazur, 1984). Estos parámetros permiten el cálculo de métodos eficientes para la adición y eliminación de los CP permeables, la tasa de congelación / descongelación necesarias, para evitar la formación de hielo intracelular y el “efecto solución” ocasionado por la concentración alta de solutos (Palasz & Mapletoft, 1996).

Los CP se utilizan para provocar la deshidratación parcial de los ovocitos y embriones evitando la formación de cristales que pueden provocar daños celulares (Assumpção et al., 2008; Fahy, Mac Farlane, Angell, & Meryman, 1984; Mazur, 1984). Por su grado de penetración en la célula pueden ser intracelulares (penetrantes) o extracelulares (no penetrantes). Los intracelulares (glicerol (G), dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol), son de bajo peso molecular y deshidratan la célula, luego penetran a ésta para ayudar a proteger el citoplasma (Leibo & Pool, 2011).

Los cambios en el volumen celular afectan varios parámetros que desempeñan un importante papel en la supervivencia del embrión; incluso la integridad de las organelas (Hotamisligil, Toner, & Powers, 1996) y la membrana plasmática por lo que deben conocerse los límites de tolerancia osmótica, para evitar la deshidratación e hidratación excesiva y predecir la adición y eliminación de los CP. Según Mazur (1984), las altas concentraciones de soluto en el medio intracelular y extracelular durante la congelación lenta pueden provocar daños celulares debido al efecto solución.

2.1 Técnica de Vitrificación de Embriones

La vitrificación es un proceso físico mediante el cual se transforma una solución en un cristal amorfo estable por un enfriamiento rápido, evitando la formación de cristales de hielo, manteniendo las propiedades de un líquido en una forma solidificada (Rall, 1987). La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución que se obtiene por medio de calentamiento o enfriamiento o mediante la mezcla con un aditivo. El fenómeno puede ser considerado como un gran aumento de la viscosidad y requiere ya sea de enfriamiento rápido de acuerdo con los cálculos teóricos, a una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 10^7 °C / min, incluso el agua pura se vitrifica (Rall, 1987), o el uso de soluciones de crioprotectoras, que reducen la formación de hielo, la formación de cristales y aumento de la viscosidad en bajas temperaturas. Hasta hace poco, las velocidades más altas de enfriamiento de los procedimientos comunes de vitrificación se limitaban a lo que podría ser logrado con la inmersión de una pajilla de inseminación de 0,25 mL directamente en el líquido nitrógeno, es decir,

aproximadamente 2500 °C/min (Palasz & Mapletoft, 1996). Estas tasas de enfriamiento requieren el uso de aproximadamente 5 a 7 Molar (M) de concentración de los crioprotectores, que es varias veces mayor que la necesaria para congelación tradicional de aproximadamente 1 a 2 M (Rall & Meyer, 1989). Factores adicionales, como un pequeño volumen de solución o un aumento considerable de la presión hidrostática, también puede facilitar la vitrificación (Fahy et al., 1984; Leibo & Pool, 2011) aunque este último tiene pocas consecuencias prácticas en la biología reproductiva.

Controversialmente, cierto grado de vitrificación se produce en cualquier método que resulta en crioconservación exitosa, incluso en la congelación lenta (de equilibrio), como consecuencia de la concentración de las soluciones en y alrededor de los embriones u ovocitos causada por la formación gradual de hielo (Rall et al., 1984). Para evitar confusiones, el término de la vitrificación en criobiología y la embriología se refiere a los métodos en que toda la solución que contiene la muestra biológica vitrifica completamente (Vajta, 2000).

La aplicación de la vitrificación en condiciones de campo reduce el equipamiento y la habilidad técnica necesaria, ofrece un costo considerable en ahorro de tiempo por embrión transferido (Van Wagendonk-de Leeuw, Den Daas, & Rall, 1997). Sin embargo, no fue hasta 1997, cuando se informó de vitrificación en un gran ensayo de campo para confirmar su eficacia como una alternativa viable a la congelación para la criopreservación de embriones de bovinos (Dobrinsky, 2002; Van Wagendonk-de Leeuw, Den Daas, & Rall, 1994, 1997). Ese estudio demostró que la vitrificación de embriones bovinos puede ser aplicada en grandes cantidades bajo condiciones de campo, sin una reducción significativa en la tasa de preñez. Las tasas

generales de preñez fueron similares después de la transferencia de embriones criopreservados por vitrificación y congelación lenta (44,5%; n = 393 y 45,1%; n = 335) respectivamente (Dobrinsky, 2002).

Una de las diferencias principales entre la vitrificación y congelación es la velocidad de la curva de enfriamiento. Una curva lenta de enfriamiento puede resultar en daños para la célula como la formación de cristales de hielo, lesión osmótica, efecto tóxico de los crioprotectores, mayor exposición a la concentración de electrolitos intracelulares, lesión durante la refrigeración, fractura de la zona pelúcida, alteraciones de organelos intracelulares, citoesqueleto y contacto célula a célula (Massip, Mermillod, & Dinnyes, 1995; Saha, Rajamahendran, Boediono, Sumantri, & Suzuki, 1996), mientras que la vitrificación elimina totalmente la formación de cristales de hielo (Vajta, 2000).

Una consecuencia negativa de la vitrificación es la probabilidad de un aumento de casi todas las formas de lesión, a excepción de las causadas por la formación de cristales de hielo. Se utilizan diferentes enfoques para minimizar los daños tóxicos, osmóticos, la combinación de dos o tres crioprotectores, incluyendo al menos uno permeable (Kaidi et al., 2001; Van Wagten donk-de Leeuw, Den Daas, & Rall, 1997) y la exposición gradual de las células a las soluciones con alta concentración de soluto (Smorag & Gajda, 1994). En los últimos 15 años, se han evaluado por lo menos 20 combinaciones diferentes de crioprotectores en la vitrificación de los ovocitos y embriones de mamíferos (Vajta, 2000), siendo estas combinaciones, con respecto a las concentraciones, los tiempos de incubación y otras condiciones casi infinitas (Rios, Mucci, Kaiser, & Alberio, 2010).

Por otro lado, a parte de la reducción significativa en la formación de cristales de hielo, la estrategia de la vitrificación se ha traducido en algunas consecuencias positivas, como el aumento de la velocidad de enfriamiento el cual disminuye el daño por frío que afecta la estabilidad lipídica de las membranas y del citoesqueleto, permitiendo pasar el enfriamiento rápidamente a través de la zona peligrosa +15°C a -5°C (Zeron, Pearl, Borochoy, & Arav, 1999). Además, la vitrificación no requiere equipos costosos o habilidades especiales.

2.2 Comparación de las Técnicas de Vitrificación y Congelación Lenta

La mayoría de las publicaciones donde se comparan la congelación lenta y vitrificación de embriones (*in vitro* o *in vivo*) transferibles de animales domésticos, son mejores los resultados en tasas de supervivencia después de la vitrificación comparados con la congelación lenta. Revisado en: (Zhao et al., 2012; Vajta & Nagy, 2006; Nedembale et al., 2004; Mahmoudzadeh, Van Soom, Ysebaert, & de Kruif, 1994). Sin embargo, la vitrificación no ha sido ampliamente aceptada por los profesionales de la transferencia de embriones y no hay signos de un cambio importante en el futuro previsible.

Al analizar las razones, los siguientes factores parecen ser importantes: a) La congelación lenta de embriones producidos *in vitro* se ha traducido en preñeces bajas en vacas, ovejas y cabras, y el menor porcentaje alrededor del 20 al 10 inferior a los resultados después de la transferencia frente de embriones frescos y congelados no se ha logrado reducir en laboratorios comerciales y de investigación (Galli & Lazzari, 2008; Niemann, 1991 citado en Vajta & Nagy, 2006); b) La diversidad extrema en los métodos de vitrificación y la falta de un protocolo

normalizado (Tabla 1) disuade a los profesionales que transfieren los embriones en campo. Además, la mayoría de los resultados comparativos disponibles se basan en la transferencia de embriones producidos *in vitro*, donde la menor calidad del embrión puede influir en el resultado (Mara, Casu, Carta, & Dattena, 2013; Vajta, 2000); c) Las ventajas prácticas de la vitrificación son relativas, el tiempo requerido para la vitrificación puede ser tan corto como 3 minutos, pero esto es por cada gota que debe ser enfriada de forma individual. Por otro lado, hay poco interés para la difusión de equipos que producen las empresas en tecnología, como la vitrificación, que se puede realizar utilizando una caja de espumas simple. El papel actual y futuro posible de la vitrificación en embriología de los animales domésticos es por lo tanto, no para sustituir a la congelación lenta, sino ofrecer soluciones para las áreas especiales donde los otros métodos han fallado en producir resultados satisfactorios (Vajta, 2000).

2.3 Técnicas y Resultados Utilizando Protocolos de Vitrificación

Los trabajos realizados con la técnica de vitrificación intentan reducir al máximo el daño celular provocado por la exposición a las concentraciones altas de crioprotectores, a reducir el volumen y área de los recipientes utilizados durante el proceso de vitrificación. Esto llevó a ensayar una técnica de vitrificación denominada OPS (Open Pulled Straw) que consiste en adelgazar una pajilla plástica de 0,25 mL, calentándola sobre una platina y estirándola en su parte central hasta que su diámetro interior llegue a un diámetro interno entre 0,7- 0,8 mm. Luego de enfriada la pajilla se corta en su parte más delgada, el embrión se recoge con esta pajilla mediante capilaridad y luego se sumerge inmediatamente en NL₂. Utilizando este

método, los embriones luego de calentados sobrevivieron al cultivo en un 81% (Vajta, Booth, Holm, Greve, & Callesen, 1997).

Kong et al. (2000) vitrificaron en una ultra mini pajilla (1,0 – 0,8 mm de diámetro) para reducir el daño por el alto volumen de la SV, obteniendo tasas de desarrollo a la descongelación y cultivo del 72%.

Asimismo se ha ensayado otros tipos de contenedores para la vitrificación de embriones, como son las gradillas de cobre para microscopio electrónico (Martino, Songsasen, & Leibo, 1996) y las mallas de nylon (Matsumoto, Jiang, Tanaka, Sasada, & Sato, 2001). En estos contenedores se logró vitrificar de 15 a 65 embriones a la vez. Los resultados obtenidos utilizando estas técnicas de vitrificación fueron similares a sus controles y ofrecen una nueva alternativa para criopreservar gran número de embriones.

Tabla 1. Protocolos, concentración, tiempos y resultados de vitrificación de embriones bovinos producidos In Vitro

Referencia	Estadio Embrionario	Medio de Estabilización y tiempo	Medio Vitrificante y tiempo	Tasa de Expansión	Tasa de Eclosión
Donnay et al., 1998	Blastocisto	1) 10% G, 5 min 2) 10% G+20% EG, 5 min	25% G+25% EG, 30 seg	67%	53%
Sommerfeld y Niemann, 1999	Blastocisto y Blastocisto Expandido	3,6M EG Diferente CIV 1) 10% NBSC 2) 20% NBSC 3) 0,1% PVA, 1 min	7,2M EG, 2 min	1) 41,8% 2) 51,4% 3) 9,9%	1) 44,5% 2) 48,2% 3) 48,2%
Nedembale et al., 2004	Blastocisto	VS3a: 6,5M G en DBPS y 6% peso/volumen, BSA, 20 min	65% de VS3a: 4,2M G y 6% BSA en DBPS, 30 seg.	64%	54%
Nedembale, Du, Yang y Tiam, 2006	Blastocisto Expandido	Diferente medio post calentamiento 10% EG en M199 y 20% FBS, 5 min	35% EG, 0,5M Sucrosa, 5% PVP en M199 y 20% FBS, 1 min.	1) CR1: 60% 2) CR1 + 100µM β-Me: 82%. 3) KSOM: 50% 4) KSOM + 100µM β-Me: 72% 5) SOF: 66% 6) SOF+ 100µM β-Me: 91%. 7) KSOM-SOF: 74% 8) KSOM-SOF +100µM β-Me: 94%	1) 48% 2) 71% 3) 18% 4) 46% 5) 43% 6) 77% 7) 47% 8) 81%

Referencia	Estadio Embrionario	Medio de Estabilización y tiempo	Medio Vitrificante y tiempo	Tasa de Expansión	Tasa de Eclosión
Mucci et al., 2006	Blastocisto y Blastocisto Expandido	1,78M EG y 1,3M DMSO (TCM-199, 20% ECS), 3 min	3,56M EG, 2,6M DMSO y 0,5M Sucrosa en medio PBS, 3 min.	1) 52,1% en CR1 – BSA 2) 50,3% en CR1 – ECS	1) 43% 2) 21,5%
Yu et al., 2010	Mórula y Blastocisto Temprano	10% EG y 10% DMSO (TCM - 199, 10% FBS), 3 min.	20% EG y 20% DMSO, 18% Ficoll 70 y 0,5M Sucrosa, PBS, 25 seg.	1) 58% OPS 2) 56,3% CPS	
Stinshoff et al., 2011	Blastocisto Expandido	Medioestabilización comercial VitriStore Freeze ®, 2 - 3 min	Medio vitrificación comercial VitriStore Freeze ® (20% EG y 20% DMSO), 40 seg	81,1% con gancho de vitrificación	63,2%
Kim et al., 2012	Blastocisto	1) Sin medio de estabilización 2) 1,5M EG y 10%, FBS, 3min 3) Sin medio de estabilización	5,5M EG, 1M Sucrosa y 10% FBS, 20 seg	1) 77,2% 2) 64,9% a) Contenedor Pajilla: 73,9% b) Contenedor Cryoloop: 76,2% c) Contenedor rejilla ME: 78,1% d) Contenedor OPS: 80,2% e) Contenedor Papel: 95,8%	1) 70,1% 2) 54,8% a) 51,9% b) 67,3% c) 68% d) 70,9% e) 71,9%
Zhao et al., 2012	Blastocisto	10% EG y 10% DMSO, DBPS con 3mg/mL BSA, 30 seg	15% EG y 15% DMSO, Ficoll 300mg/mL, 171,2 g/L Sucrosa, 3mg/mL, 25 seg.	Contenedor OPS, 92,24%	
Sanches et al., 2013	Blastocisto	10% EG y 10% DMSO en TCM 199 + 20% FBS, 1 min	20% EG y 20% DMSO + 0,5M Sucrosa, 20 seg	Sin Forskolin 79,2% Con 10 µM Forskolin 87,5%	63,3% 70,5%

3. . METODOLOGÍA

3.1 Ubicación Geográfica

El estudio se realizó en la ciudad de Bogotá, Cundinamarca, Colombia. El área de estudio se encuentra en una altura promedio de 2600 msnm, precipitación media anual de 1,013 mm y una humedad relativa de 72% con una temperatura promedio de 13,5 °C. Geográficamente se encuentra posicionado a 4° 35' de latitud norte y 74° 04' de longitud occidente, con respecto al meridiano de Greenwich.

3.2 Población y Muestra

La población correspondió a embriones bovinos producidos *in vitro* a partir de ovarios de matadero provenientes de hembras bovinas de ganaderías de razas holsteina y los frigoríficos de Zipaquirá y Chía. Se utilizaron mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos de excelente y buena calidad según la International Embryo Transfer Society (IETS). Un total de 344 embriones se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos: Congelación lenta, soluciones vitrificantes comerciales V1 y soluciones vitrificantes preparadas en laboratorio V2.

3.3 Métodos y Procedimientos

Para la estandarización de las técnicas de congelación / descongelación y vitrificación / calentamiento se realizaron ocho procesos de producción de embriones *in vitro*. Para lograr el entrenamiento en cada una de las técnicas de

crioconservación, del manejo de los medios, embriones, curvas de enfriamiento y empaque de los embriones se requirió recuperar el 100% de los embriones completos y sin fractura de la zona pelúcida en cada una de estas fases. Luego de este entrenamiento, se procedió a realizar la fase experimental para comparar los tratamientos para cada grupo, donde se evaluó expansión y eclosión posterior al cultivo *in vitro* a las 24, 48 y 72 horas.

3.3.1 Producción *In Vitro* de Embriones Bovinos. A menos que se indique lo contrario todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma – Aldrich (Steinheim, Alemania).

Los ovarios bovinos se recolectaron en un matadero local, dispuestos en solución salina (NaCl 0,9%) a 37° C y transportados al laboratorio dentro de 1 a 4 horas. Los complejos cúmulo-ooocito (CCO) se aspiraron de folículos ováricos (2 – 8mm en diámetro) usando una aguja calibre 18 y jeringa de 10 mL. El fluido folicular se depositó en un tubo cónico de 50 mL y posteriormente vertido en una caja de Petri estéril de 60 x 15 mm. Seguido se procedió a la búsqueda mediante el uso de un estéreomicroscopio, CCO con citoplasma homogéneo, tres o más capas de células de cúmulos y morfología intacta fueron los parámetros de los oocitos para llevarlos a maduración.

Los CCO se maduraron en medio de cultivo tisular 199 (TCM199; Sigma), que contenían 2,5 mM Na-piruvato, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 1mg/mL de estradiol -17 β, 10 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH, 10%

de suero fetal bovino (SFB), a 39°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂, 20% de O₂.

El semen congelado y descongelado proveniente de un toro de raza Holstein con fertilidad demostrada *in vitro* se empleó para la fertilización y el proceso de capacitación mediante swim-up. Espermatozoides (1×10^6 espermatozoides/mL) y CCO madurados (40-45 CCO/200 µl) fueron co-incubados en medio modificado Fert-TALP, el cual contiene 0,01mM de heparina, 0,2 mM penicilina, 0,1 mM de Hipotaurina a 38,5°C entre 18 y 24 horas en 5% CO₂ en aire humidificado. Los presuntos cigotos se agitaron durante 90 segundos en HEPES –TALP para eliminar las células de cúmulos. Después fueron lavados una vez en H-TCM199 y dos más en fluido sintético oviductal y después se cultivaron como se describe anteriormente. La incubación se realizó a 38,5°C bajo 5% de CO₂ en aire humidificado (Asgari, Hosseini, Forouzanfar, Hajian, & Nasr-Esfahani, 2012; Hosseini et al., 2008).

3.3.2 Congelación y Descongelación. Entre el día 6 y 7 mórulas, blastocistos y blastocistos expandidos se criopreservaron de forma convencional usando una congeladora programable (Cryologic CL5500, Australia). Los embriones se suspendieron en solución tampón fosfato Dulbecco (D-PBS), suplementados con 1,5 M de etilenglicol (EG), 0,1 M Sucrosa y 5 mg / mL de albumina sérica bovina (BSA). Pasados 10 minutos en el periodo de equilibrio, los embriones fueron cargados en pajillas de 0,25 mL (1 o 2 embriones por pajillas) las cuales fueron cerradas con alcohol polivinil. Las pajillas se colocaron en la congeladora programable a una temperatura de – 7°C, luego de 5 minutos se realizó el *seeding* manual con un hisopo enfriado en nitrógeno líquido (NL₂) sobre las pajillas, se estabilizaron a esta

temperatura durante 5 minutos y posteriormente las pajillas se congelaron hasta -35°C con una velocidad constante de $0,5^{\circ}\text{C}$ minutos. Finalmente las pajillas se sumergieron en NL_2 y se almacenaron por un tiempo no superior a una semana.

Para la descongelación las pajillas se llevaron a baño María a 30°C durante 30 segundos, inmediatamente se secaron y cortaron. Los embriones se depositaron en una caja de Petri, a su vez rehidratados en medio de mantenimiento PBS durante 8 minutos.

3.3.3 Vitricación y Calentamiento. Mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos se vitrificaron utilizando un gancho de vitricación WTA (Watanabe Tecnología Aplicada; WTA, Brasil). El método empleado consistió de una cava de icopor, en su interior se puso un recipiente plástico y dentro de este el bloque de vitricación (Watanabe Tecnología Aplicada; WTA, Brasil). Tanto el interior como el exterior se encontraban inmersos en NL_2 (Figura 1).



Figura 1. Cava de icopor con NL_2 utilizada para mantener el bloque de vitricación.

Después de pasar los embriones por cada microgota de las soluciones vitrificantes estos eran transferidos al gancho de vitrificación (2 – 4 embriones) y el gancho se froto con delicadeza sobre la parte superior del bloque permitiendo la formación de una gota delgada, vitrificada con los embriones (Figura 2). Al formarse dicha gota vitrificada el gancho se introdujo en la pajilla hasta sellarla por presión y finalmente se sumerge en NL_2 .

Para el calentamiento, las pajillas que se encontraban en NL_2 se abrieron y se extrajeron los ganchos de vitrificación (Figura 3). La gota vitrificada presente en cada gancho fue transferida a una placa con soluciones de calentamiento, al finalizar los tiempos de cada protocolo los embriones fueron puestos en una placa de cultivo.

3.3.4. Vitrificación y Calentamiento con Kit comercial Achilles Genetics – Vitrogen.

Por ser un protocolo de tipo comercial se desconoce la composición de las soluciones vitrificantes (Achilles Genetics ®). El montaje de la placa de vitrificación y calentamiento consistió en un sistema de microgotas de 5 μ l. Los embriones se vitrificaron transfiriéndolos en un medio de equilibrio por 2 min, una solución de vitrificación 1 por 2 min y una solución de vitrificación 2 por 45 segundos bajo una temperatura de 27°C. Para el calentamiento, los embriones se transfirieron a una solución de calentamiento 1 (SDV1) por 2 minutos, a una solución de calentamiento 2 (SDV2) por 2 minutos y finalmente a medio de cultivo por 2 minutos bajo una temperatura de 34°C.

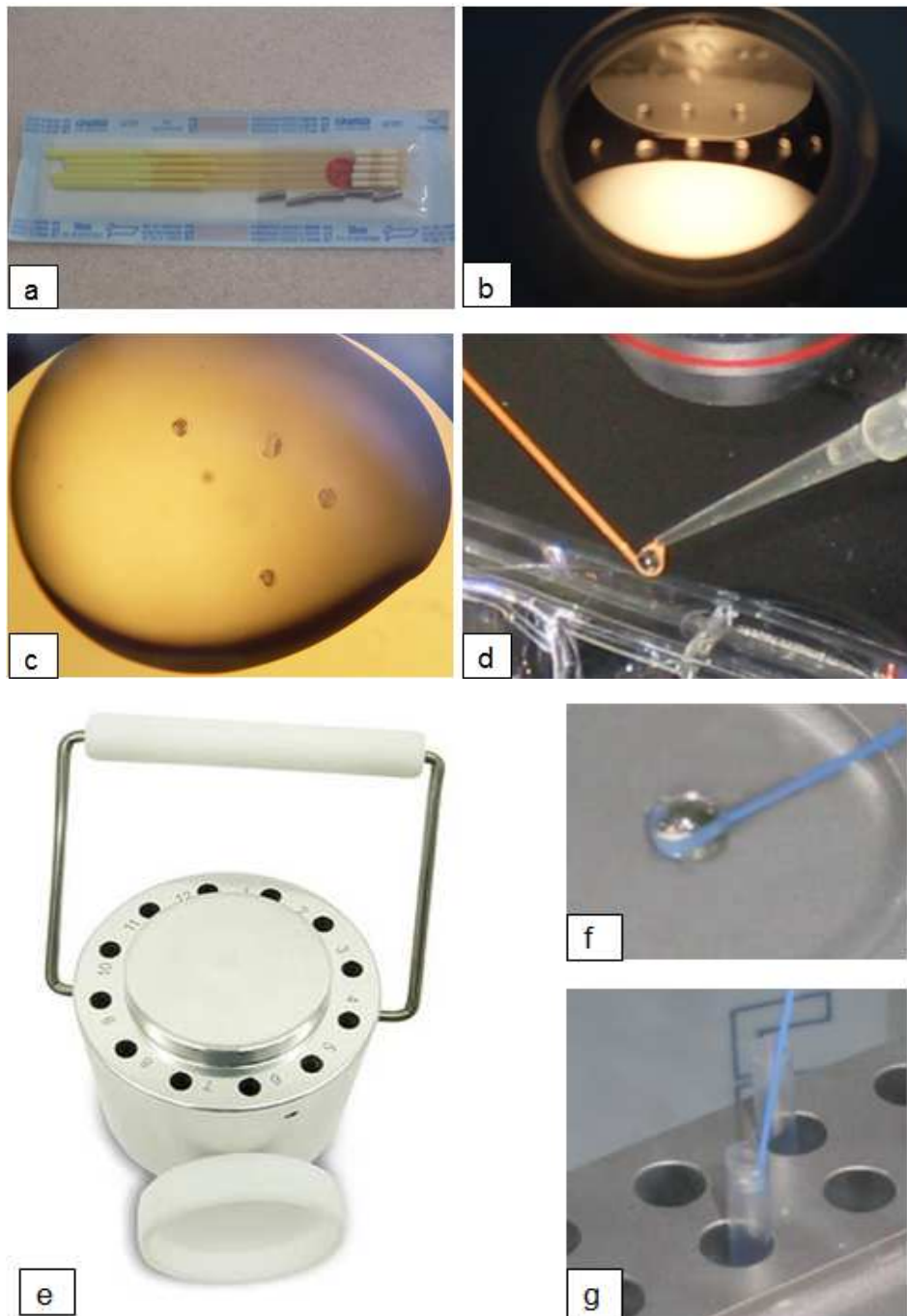


Figura 2. Elementos utilizados durante el proceso de vitrificación. (a) Ganchos de vitrificación; (b) Caja de Petri con gotas de soluciones vitrificantes; (c) Embriones bovinos producidos *in vitro* en solución vitrificante; (d) Transferencia de embriones en el gancho de vitrificación; (e) Bloque de vitrificación WTA; (f) Solidificación de la solución vitrificante; (g) Transferencia de la gota vitrificada a la pajilla. Imágenes d, f, g Tomadas CryoLogic, (CVM Kit, 2008).

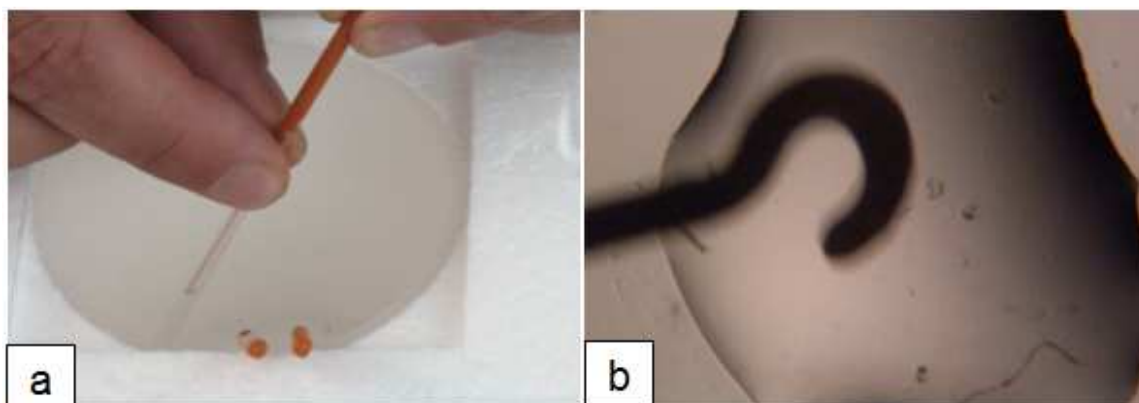


Figura 3. Calentamiento de embriones bovinos producidos in vitro. (a) Desembalaje del gancho de vitrificación; (b) Traslado de los embriones desde el gancho a la solución de calentamiento.

3.3.4.1 Protocolo de Vitrificación Utilizando un Medio Preparado en el Laboratorio. Los embriones se equilibraron en una solución correspondiente TCM + 20% de SFB por 5 minutos, una solución de vitrificación 1 compuesta por TCM + 20% SFB + 10% de EG, (EG; Sigma, E 9129) + 10% DMSO; (DMSO, Sigma 5879) y una solución de vitrificación 2 compuesta por TCM + 20% SFB + 20% EG + 20% DMSO por 30 segundos. Se trabajó a una temperatura ambiente. Para el calentamiento, la placa y los medios se encontraban en una temperatura de 39°C, además se prepararon 500 μ l de TCM + 20% SFB + 0,2 M de Sucrosa, Sigma, S 9378).

3.3.5 Poscriopreservación y Tasa de Supervivencia. Después de descongelar o calentar los embriones se transfirieron a gotas cubiertas con medio de cultivo humidificado en una atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂ y 90 de N₂. La viabilidad *in vitro* se

evaluó mediante la capacidad de reexpansión entre las 24, 48 y 72 horas (tasa de supervivencia) y para eclosionar a las 24, 48 y 72 horas (tasa de eclosión).

3.4 Diseño y Análisis Estadístico

Las tasas de expansión y eclosión seguidas de los procesos de descongelación y calentamiento se analizaron mediante la prueba de chi cuadrado, usando el programa Statistix8.0. Una probabilidad de $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativa.

4. RESULTADOS

4.1 Estandarización de las Técnicas de Vitrificación y Calentamiento

El trabajo en la fase de entrenamiento permitió adquirir habilidades en el manejo de medios, tiempo de los protocolos, montaje de las placas y de los embriones entre gotas para llevarlos posteriormente al gancho de vitrificación. Todo esto seguido de los procesos necesarios para el almacenamiento y cultivo *in vitro* poscriopreservación. Para los dos protocolos de vitrificación (V1 y V2) se empleó el mismo sistema de microgotas, las variaciones entre cada uno corresponden a los tiempos y concentración de los crioprotectores. Sin embargo, el número de embriones dispuestos para cada gancho (2 – 4), sumado a la rigurosidad de tiempo para cada protocolo dificulta el paso de los mismos entre cada microgota y mayor aun cuando son 4 embriones. La práctica de este método permite obtener habilidades con lo cual al final no se hace tan complicado realizarlo.

Adicionalmente, el cambio en la concentración de las soluciones vitrificantes de V1 a la V2 (Figura 4) genera que los embriones floten por algunos segundos y a su vez que la manipulación entre microgotas sea algo más complejo. De igual forma fue posible evidenciar los cambios morfológicos que sufrieron los embriones cuando entraron en contacto con la soluciones vitrificantes. Fácilmente se notó la contracción inicial leve de las blastómeras en el medio de V1, hasta una contracción mayor en el medio V2.

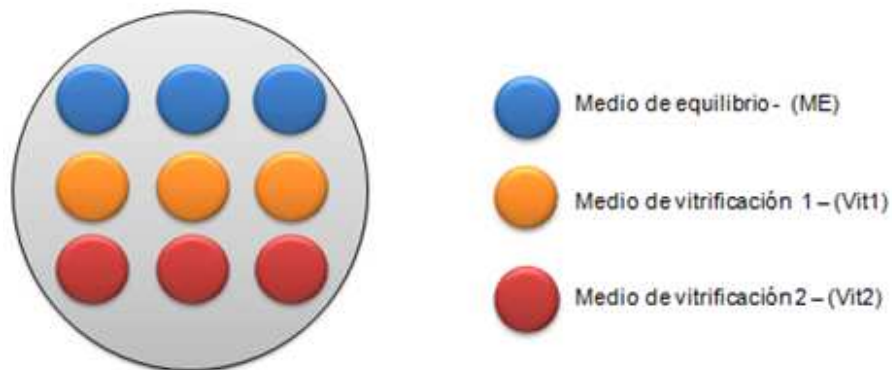


Figura 4. Sistema de microgotas empleado para los procesos de vitrificación.

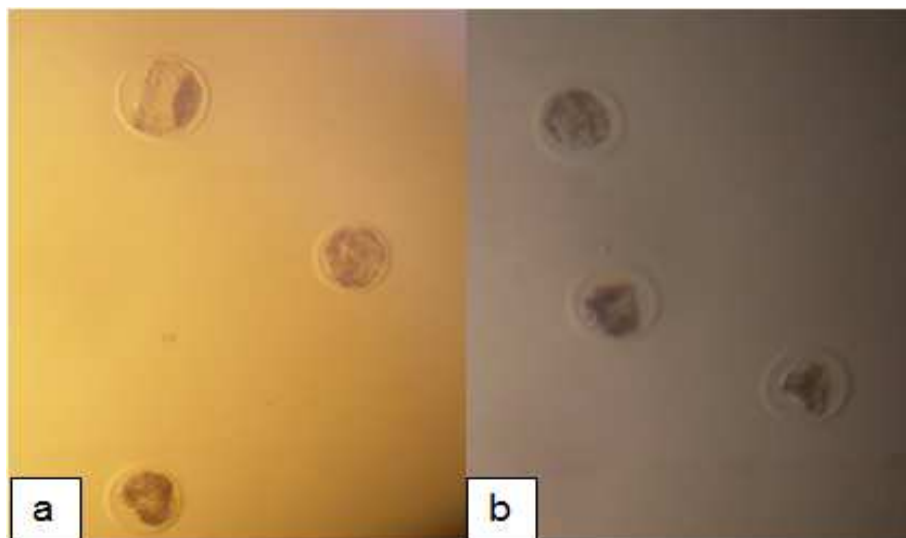


Figura 5. Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro. (a) Embriones en medio de vitrificación 1. (b) Embriones en medio de vitrificación 2.

El calentamiento, es un procedimiento sencillo, aunque la manipulación lenta del gancho cuando se saca de su empaque puede generar que los embriones se calienten dentro de la pajilla y se pierdan dentro de la misma. Asimismo el cambio de presión en el contenedor del gancho cuando se retira del NL_2 genera que este se

quiebre y se pierda la muestra. Cuando se depositó la muestra en la gota de decalentamiento se fueron rehidratando lentamente, adquiriendo una forma simétrica de acuerdo con el estado de desarrollo del embrión. En el medio de cultivos los embriones dispuestos de 8 a 10 por microgota se evaluaron durante 24, 48 y 72 horas, se observaron embriones expandidos, eclosionados y degenerados en cada microgota y no se retiraron de las gotas hasta terminadas estas evaluaciones.

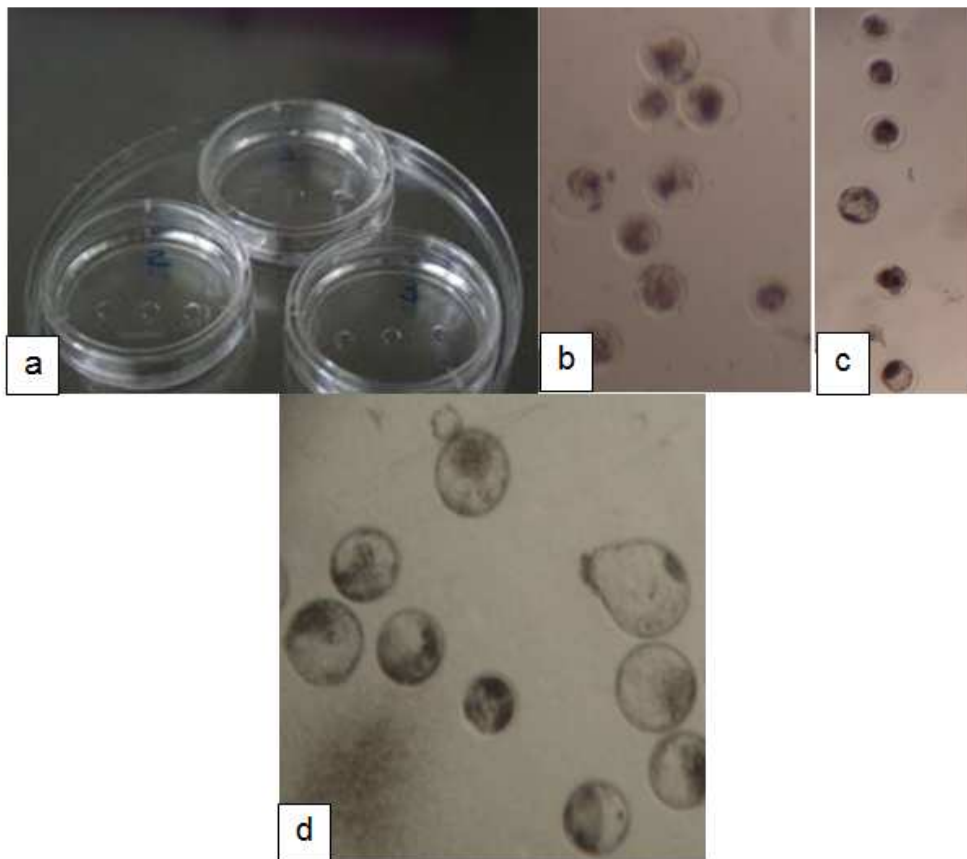


Figura 6. Embriones en Medio de cultivo. (a) Placas de cultivo. (b) Embriones en medio de cultivo a las cero horas. (c, d) Embriones en medio de cultivo 24 – 48 horas

4.2 Tasa de Expansión

Un total de 344 embriones bovinos (mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos) producidos *in vitro* a partir de ovarios de matadero fueron distribuidos aleatoriamente en el grupo de congelación y los grupos de vitrificación V1 y V2. En la Tabla 2, se presentan las tasas de expansión a las 24 horas y eclosión total luego de las 72 horas de cultivo *in vitro* de los métodos de criopreservación utilizados.

Tabla 2. Efecto del método de criopreservación de embriones producidos *in vitro* sobre el porcentaje de expansión a las 24 horas y el porcentaje de eclosión total, evaluadas mediante cultivo *in vitro* posterior al calentamiento.

Método	n	% Expansión 24h (n)	% Eclosión Total (n)
Congelación Lenta	114	73,6 ^b (84)	55,2 ^c (63)
Vitrificación 1	128	89,0 ^a (114)	64,0 ^b (82)
Vitrificación 2	102	86,2 ^a (88)	84,3 ^a (86)

Valores con diferentes letras (a,b, c) dentro de las columnas indica diferencias estadísticas ($P < 0,05$).

La tasa de expansión a las 24 horas (Figura 6) presentó diferencias significativas ($P < 0,05$), donde la V1 y V2 lograron mayor expansión comparadas con CI (89% y 86%; 73,6%, respectivamente). A las 48 horas no se presentaron diferencias significativas entre los métodos de criopreservación, aunque la CI presentó mayor expansión (52,6%, 40,6% y 50,9%, respectivamente). A las 72 horas se presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), donde CI y V1 presentaron mayor expansión comparadas con V2 (21,9% y 31,2%; 9,8% respectivamente).

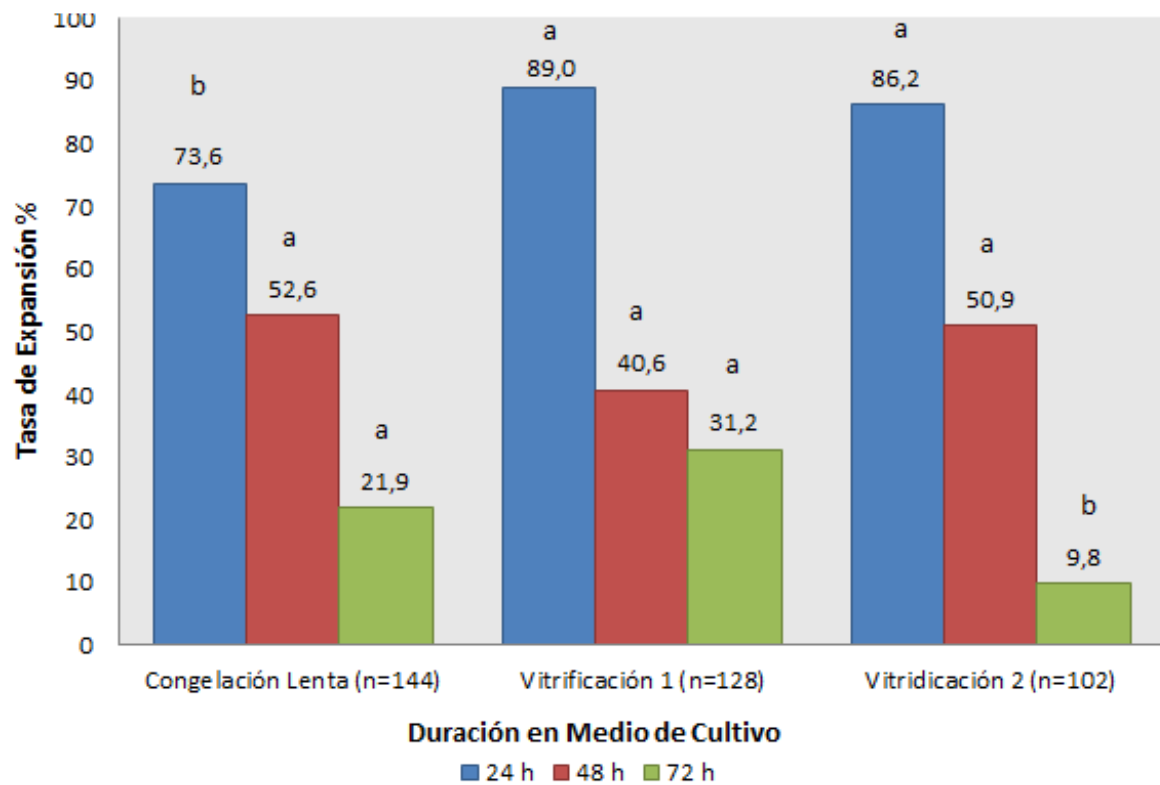


Figura 7. Efecto de los métodos de criopreservación sobre la tasa de expansión de mórulas, blastocistos tempranos y blastocistos fueron observados luego del calentamiento. Literales a, b dentro un intervalo de tiempo corresponde a la diferencia entre métodos ($P < 0,05$).

4.3 Tasa de Eclosión

La tasa de eclosión a las 24 horas fue similar entre los protocolos V1 y V2 (48,4% y 36,2%) y superiores a CI (21,5%; $P < 0,05$). La tasa de eclosión embrionaria a las 48 horas fue similar para CI y V2 (30,7% y 41,1%) y la menor tasa para V1 (9,5%). A las 72 horas se presentaron las menores tasas de eclosión y similares entre los protocolos.

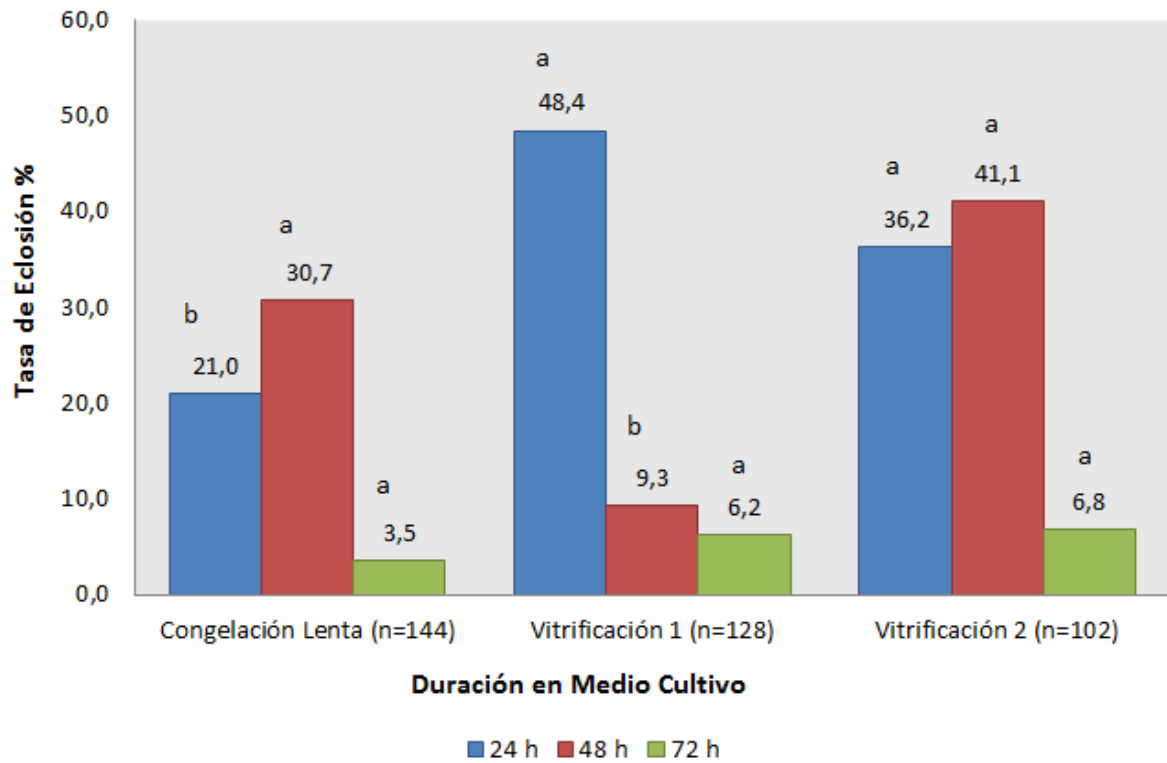


Figura 8. Efecto de los métodos de criopreservación sobre la tasa de eclosión. Mórulas, Blastocistos tempranos y Blastocistos fueron evaluados luego del calentamiento hasta las 72 h. Los literales a y b dentro un intervalo de tiempo corresponde a la diferencia entre métodos ($P < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado para investigar el efecto de las técnicas de congelación lenta y vitrificación sobre la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro* bajo las mismas condiciones de cultivo en un laboratorio de producción comercial. Los resultados de este estudio evidenciaron diferencias en la tasa de expansión y de eclosión.

Los embriones luego de la descongelación / calentamiento presentaron en su mayoría blastómeras contraídas con un claro contorno citoplasmático y una apariencia normal de la zona pelúcida, sin embargo algunos de ellos a los 30 minutos de cultivo *in vitro* ya presentaban un aspecto oscuro, con restos celulares en el espacio perivitelino, lo cual también ha sido descrito por Kasai, Ito, & Edashige, 2002; Mucci et al., 2006, adicionalmente estos embriones no logran expandirse ni eclosionar. Los embriones que no logran expandirse o eclosionar en el medio de cultivo *in vitro* son aquellos que mueren durante el proceso de criopreservación; muerte que puede suceder en alguno de los pasos antes o después de su conservación en el nitrógeno líquido. La muerte celular es mediada por diferentes factores como el efecto solución, cambios drásticos de volumen celular, la formación de cristales intracelulares (Whittingham, Wood, Farrant, Lee, & Halsey, 1979), toxicidad y cambios en metabolismo y en el pH embrionario (Asgari, et al., 2012).

De igual forma, al sumergir el embrión en la mezcla crioprotectora se evidencia una pequeña contracción de su diámetro, reduciendo en un 40% aproximadamente, el volumen isotónico del blastocito, perdiendo la forma esférica y adquiriendo formas elipsoidales durante aproximadamente 1 minuto. Esto debido a que el ambiente hiperosmótico favorece la deshidratación de las células, sabiendo que la permeabilidad de la membrana celular de los embriones al agua es 2000 a 3000 veces mayor que la del crioprotector más permeable (Kaidi, Donnay, Lambert, Dessy, & Massip, 2000); es decir, el agua abandona la célula más rápidamente que el ingreso del crioprotector a la misma (Cabrera, et al., 2008).

La contracción de las blastómeras es detenida al momento de balancear el exflujo de agua y el influjo de crioprotector, seguido de una lenta expansión, a medida que el crioprotector continúa penetrando al citoplasma celular al igual que penetra agua. Estas modificaciones en el volumen del blastocito son repetidas en las siguientes gotas, llegando al más alto grado de deshidratación en la última gota, observándose siempre un diámetro menor de la masa celular, a medida que aumenta la concentración de los crioprotector, cambios descrito también por Zhu, Kasai, Otoge, Sakurai, & Machida, (1993); a su vez, estos autores resaltan que en los protocolos de dos o más pasos las variaciones en el volumen son graduales, deteriorando en menor intensidad a la célula.

En este trabajo de investigación se demostró que la técnica de vitrificación presentó mejores resultados que la congelación lenta. En referencia, hasta el momento es posible encontrar una amplia literatura donde se detallan experimentos comparativos entre congelación lenta y vitrificación, la mayoría de estas publicaciones prueba la superioridad de la vitrificación para este propósito.

Probablemente menos del 10% no encontraron diferencias significativas y no se conocen resultados donde la vitrificación es significativamente menor que la congelación lenta (Vajta, Nagy, Cobo, Conceicao, & Yovich, 2009; Vajta & Nagy, 2006).

No obstante, los protocolos de criopreservación son el producto del ensayo y error en cada laboratorio que los lleva a desarrollar un protocolo específico para un mismo laboratorio y los resultados también dependen de la experiencia del operario que los aplica (Bruyère et al., 2012). De esta manera se induce a variaciones entre los estudios, entre laboratorios, sus protocolos como se muestra en la tabla 1, y por ende es complejo realizar comparaciones directas con este trabajo. Asimismo se dificulta comparar supervivencia, tasas de expansión y tasas de eclosión debido a varios factores, tales como el origen genético, las condiciones ambientales, de cultivo y concentraciones específicas de los criopreservantes, como lo afirman Gómez et al. (2008), que puede generar un fuerte impacto para el éxito la criopreservación del embrión.

Sin embargo, el uso de los diferentes medios de cultivo ha permitido la documentación de diferencias morfológicas poscriopreservación indicando a la vitrificación como el método ideal para la criopreservación de embriones bovinos producidos *In vitro*. En la vitrificación el efecto de toxicidad química por los crioprotectores es el factor negativo más importante (Kuwayama, 2007).

Además se presentaron diferencias significativas entre los dos medios de vitrificación trabajados, esto puede ser atribuido al aumento de pasos en los protocolos, generando una diferencia de menor concentración de los crioprotectores entre las microgotas y el tiempo de exposición a las mismas. Por ende, al colocar los

embriones en las microgotas, se evidencia que estos flotan durante 10 segundos sedimentándose en forma lenta en el fondo de la placa, siendo este descenso más lento a medida que la concentración de los crioprotectores es mayor, esto se debe a la viscosidad de la solución (Cabrera et al., 2008).

Los resultados obtenidos en los procesos de vitrificación fueron significativamente mejores que los observados con el método de congelación lenta y esto se puede atribuir a que la vitrificación minimiza los daños por congelación (Vajta et al., 1998). Estos datos sugieren la aplicación y desarrollo de la vitrificación representando una alternativa competitiva para la criopreservación de embriones (Dobrinsky, 2002) ya que simplifica y acelera considerablemente el proceso de criopreservación sin requerir de costosos equipos.

6. CONCLUSIONES

Respecto a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis planteada para este proyecto en la cual la técnica de vitrificación presentó mayores tasas de expansión y eclosión comparadas con la congelación lenta. Adicionalmente es de resaltar que los estudios de criopreservación en embriones bovinos avalan a la vitrificación como un método de alta aplicabilidad, siendo una técnica con aportes óptimos de viabilidad. A pesar de que la técnica se ve tediosa por el régimen de cada protocolo, cuando se logra un manejo de medios y una buena manipulación de los embriones pasa a ser de fácil ejecución.

No obstante, es necesario seguir trabajando, perfeccionando e investigando en nuevos métodos de vitrificación que permitan llegar a un protocolo estándar que pueda ser ajustado a diferentes estadios embrionarios. Basado en el hecho de que cada estadio cuenta con una estructura, metabolismo diferente y consecuentemente sensibilidad a daños por criopreservación. La importancia de los resultados obtenidos radica en que aquí en Colombia se sigue trabajando con el protocolo de congelación lenta y aunque en algunos casos ha sido eficiente, la vitrificación podría ofrecer nuevas perspectivas a nivel comercial convirtiéndose en un método con el cual se obtendrían mayores preñeces. Se recomienda posteriormente evaluar las tasas de preñez comparando la transferencia de embriones criopreservados con el medio de vitrificación preparado en el laboratorio.

7. LISTA DE REFERENCIAS

- Arav, A., Lauria, A., & Gandolfi, F. (1992). Vitrification of oocytes and embryos. *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. Lauria, A. And Gandolfi, F.(eds.), Portland Press, London and Chapel Hill, 255-264.
- Asgari, V., Hosseini, S. M., Forouzanfar, M., Hajian, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Vitrification of in vitro produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. *Cryobiology*, 65(3), 278-283. doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.08.002
- Assumpção, M., Milazzotto, M., Simões, R., Nicacio, A., Mello, M., & Visintin, J. (2008). In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Anim. Reprod*, 5(3/4), 116-120.
- Bielanski, A., & Hare, W. (1988). Survival in vitro of bovine demi-embryos after freezing by slow cooling rates or vitrification. *Theriogenology*, 29(1), 223-223.
- Bruyère, P., Baudot, A., Guyader-Joly, C., Guérin, P., Louis, G., & Buff, S. (2012). Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*, 78(6), 1294-1302. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.05.025

- Cabrera, P., Fernández, A., Bastidas, P., Perozo, E., Molina, M., Bethencourt, A., Díaz, T. (2008). Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad morfológica de embriones murinos (*Mus musculus*). *Zootecnia Tropical*, 26(1), 27-34.
- Coticchio, G., Bonu, M., Borini, A., & Flamigni, C. (2004). Oocyte cryopreservation: a biological perspective. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 115, S2-S7.
- Dobrinsky, J. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57(1), 285-302.
- Donnay, I., Auquier, P., Kaidi, S., Carolan, C., Lonergan, P., Mermillod, P., & Massip, A. (1998). Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*, 52(2), 93-104.
- Fahy, G., Mac Farlane, D., Angell, C., & Meryman, H. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21(4), 407-426.
- Galli, C., & Lazzari, G. (2008). The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 1-7.
- Gómez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, J., Hidalgo, C., Morán, E., Díez, C. (2008). Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, 69(8), 1013-1021.
- Hosseini, S. M., Moulavi, F., Hajian, M., Abedi, P., Forouzanfar, M., Ostad-Hosseini, S., Tajik, P. (2008). Highly efficient in vitro production of bovine blastocyst in

cell-free sequential synthetic oviductal fluid vs. TCM199 vero cell co-culture system. *IJFS*, 2, 66-73.

Hotamisligil, S., Toner, M., & Powers, R. D. (1996). Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biology of reproduction*, 55(1), 161.

Kaidi, S., Bernard, S., Lambert, P., Massip, A., Dessy, F., & Donnay, I. (2001). Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of reproduction*, 65(4), 1127.

Kaidi, S., Donnay, I., Lambert, P., Dessy, F., & Massip, A. (2000). Osmotic Behavior of in Vitro Produced Bovine Blastocysts in Cryoprotectant Solutions as a Potential Predictive Test of Survival* 1. *Cryobiology*, 41(2), 106-115.

Kasai, M., Ito, K., & Edashige, K. (2002). Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Human Reproduction*, 17(7), 1863-1874.

Kim, Y., Uhm, S., Gupta, M., Yang, J., Lim, J.-G., Das, Z., Kim, N.-H. (2012). Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*.

Kong, I., Lee, S., Im, Y., Cho, S., Ohh, H., Ohh, D., & Bae, I. (2000). Cryobiology-IMPROVEMENT OF POST-THAW HATCHING RATES OF IN VITRO-

PRODUCED BOVINE EMBRYOS VITRIFIED BY ULTRA-MINI STRAW. *Theriogenology*, 53(1), 258-258.

Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73-80.

Leibo, S. (2008). Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, 69(1), 37-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.10.006

Leibo, S., & Pool, T. B. (2011). The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertility and sterility*, 96(2), 269-276.

Mahmoudzadeh, A., Van Soom, A., Ysebaert, M., & de Kruif, A. (1994). Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42(8), 1389-1397.

Mara, L., Casu, S., Carta, A., & Dattena, M. (2013). Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science*.

Martino, A., Songsasen, N., & Leibo, S. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of reproduction*, 54(5), 1059.

Massip, A., & Donnay, I. (2003). Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. *Reproduction Nutrition Development*, 43(4), 325-330.

- Massip, A., Mermillod, P., & Dinnyes, A. (1995). Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction*, *10*(11), 3004.
- Matsumoto, H., Jiang, J., Tanaka, T., Sasada, H., & Sato, E. (2001). Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, *42*(2), 139-144.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *247*(3), C125.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, *65*(8), 1551-1562.
- Naik, B., Rao, B., Vagdevi, R., Gnanprakash, M., Amarnath, D., & Rao, V. (2005). Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Animal Reproduction Science*, *86*(3), 329-338.
- Nedambale, T. L., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinsky, J. R., Tian, X. C., & Yang, X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, *62*(3-4), 437-449. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.020
- Nedambale, T. L., Du, F., Yang, X., & Tian, X. C. (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in

- defined medium supplemented with [beta]-mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science*, 93(1-2), 61-75.
- Niemann, H. (1991). Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 35(1), 109-124.
- Palasz, A. T., & Mapletoft, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology advances*, 14(2), 127-149.
- Paul, J. (2007). The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species. *Genet. Sel. Evol*, 39, 465-479.
- Rall, W. (1987). Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification* 1. *Cryobiology*, 24(5), 387-402.
- Rall, W., & Meyer, T. (1989). Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*, 31(3), 683-692.
- Rall, W., Reid, D., & Polge, C. (1984). Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology*, 21(1), 106.
- Rios, G., Mucci, N., Kaiser, G., & Alberio, R. (2010). Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 118(1), 19-24.
- Saha, S., Rajamahendran, R., Boediono, A., Sumantri, C., & Suzuki, T. (1996). Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro

following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, 46(2), 331-343.

Sanches, B., Marinho, L., Pontes, J., Basso, A., Meirinhos, M., Silva-Santos, K., Seneda, M. (2013). Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*.

Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J. F., Sulon, J., & Hansen, H. (1996). Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 46(3), 527-539.

Smorag, Z., & Gajda, B. (1994). Cryopreservation of mammalian ova and embryos by vitrification. *Biotechnology advances*, 12(2), 449.

Sommerfeld, V., & Niemann, H. (1999). Cryopreservation of Bovine in Vitro Produced Embryos Using Ethylene Glycol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology*, 38(2), 95-105.

Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K., & Wrenzycki, C. (2011). Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 76(8), 1433-1441. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.013

Tripodi, A., Sturlese, E., & Cremonesi, F. (2001). Cryopreservation of oocytes after vitrification. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 28(3), 157.

Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60, 357-364.

- Vajta, G., Booth, P. J., Holm, P., Greve, T., & Callesen, H. (1997). Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letters*, 18(3), 191-195.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T., & Callesen, H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular reproduction and development*, 51(1), 53-58.
- Vajta, G., Nagy, Z., Cobo, A., Conceicao, J., & Yovich, J. (2009). Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. *Reproductive biomedicine online*, 19, 1-7.
- Vajta, G., & Nagy, Z. P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive biomedicine online*, 12(6), 779-796.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A., Den Daas, J., & Rall, W. (1994). Pregnancy rates in a comparative field trial of vitrification and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology*, 41(1), 326.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A., Den Daas, J., & Rall, W. (1997). Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48(7), 1071-1084.

- Whittingham, D., Wood, M., Farrant, J., Lee, H., & Halsey, J. (1979). Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from– 196 C. *Journal of reproduction and fertility*, 56(1), 11-21.
- Wilmut, I., & Rowson, L. (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *The Veterinary Record*, 92(26), 686.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., & Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68, S77-S83.
- Yavin, S., & Arav, A. (2007). Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, 67(1), 81-89.
- Yu, X., Deng, W., Liu, F., Li, Y., Li, X., Zhang, Y., & Zan, L. (2010). Closed pulled straw vitrification of in vitro–produced and in vivo–produced bovine embryos. *Theriogenology*, 73(4), 474-479.
- Zeron, Y., Pearl, M., Borochoy, A., & Arav, A. (1999). Kinetic and Temporal Factors Influence Chilling Injury to Germinal Vesicle and Mature Bovine Oocytes* 1. *Cryobiology*, 38(1), 35-42.
- ZHAO, X.-m., DU, W.-h., WANG, D., HAO, H.-s., QIN, T., LIU, Y., & ZHU, H.-b. (2012). Controlled Freezing and Open-Pulled Straw (OPS) Vitrification of *In vitro* Produced Bovine Blastocysts Following Analysis of ATP Content and Reactive Oxygen Species (ROS) Level. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(3), 446-455.

Zhu, S., Kasai, M., Otoge, H., Sakurai, T., & Machida, T. (1993). Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *Journal of reproduction and fertility*, 98(1), 139-145.

8. ANEXOS

Anexo A. Salida de Datos Estadísticos

Statistix 8.0
07:22:33 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence

for expandido = tiempo método

método

tiempo		conv	vitridos	vitriuno	
24	Observed	84	88	114	286
	Expected	92.06	81.71	112.22	
	Cell Chi-Sq	0.71	0.48	0.03	
48	Observed	60	52	52	164
	Expected	52.79	46.86	64.35	
	Cell Chi-Sq	0.98	0.56	2.37	
72	Observed	25	10	40	75
	Expected	24.14	21.43	29.43	
	Cell Chi-Sq	0.03	6.10	3.80	
		169	150	206	525

Overall Chi-Square 15.06
P-Value 0.0046
Degrees of Freedom 4

Cases Included 60 Missing Cases 0

Statistix 8.0
07:25:45 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence
for eclosiona = tiempo método

método		conv	vitridos	vitriuno	
tiempo					
24	Observed	24	37	62	123
	Expected	33.55	45.79	43.66	
	Cell Chi-Sq	2.72	1.69	7.70	
48	Observed	35	42	12	89
	Expected	24.27	33.13	31.59	
	Cell Chi-Sq	4.74	2.37	12.15	
72	Observed	4	7	8	19
	Expected	5.18	7.07	6.74	
	Cell Chi-Sq	0.27	0.00	0.23	
63	86	82	231		
Overall Chi-Square		31.87			
P-Value		0.0000			
Degrees of Freedom		4			
Cases Included		60	Missing Cases 0		

Statistix 8.0
07:42:53 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence
for expandido = tiempo método

método				
tiempo		conv	vitriuno	
24	Observed	84	114	198
	Expected	89.23	108.77	
	Cell Chi-Sq	0.31	0.25	
48	Observed	60	52	112
	Expected	50.47	61.53	
	Cell Chi-Sq	1.80	1.47	
72	Observed	25	40	65
	Expected	29.29	35.71	
	Cell Chi-Sq	0.63	0.52	
		169	206	375

Overall Chi-Square 4.98
P-Value 0.0831
Degrees of Freedom 2

Cases Included 39 Missing Cases 0

Statistix 8.0
07:44:14 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence
for eclosiona = tiempo método

método				
tiempo		conv	vitriuno	
+-----+-----+				
24	Observed	24	62	86
	Expected	37.37	48.63	
	Cell Chi-Sq	4.78	3.67	
+-----+-----+				
48	Observed	35	12	47
	Expected	20.42	26.58	
	Cell Chi-Sq	10.41	8.00	
+-----+-----+				
72	Observed	4	8	12
	Expected	5.21	6.79	
	Cell Chi-Sq	0.28	0.22	
+-----+-----+				
		63	82	145
Overall Chi-Square		27.36		
P-Value		0.0000		
Degrees of Freedom		2		
Cases Included	39	Missing Cases	0	

Statistix 8.0
07:50:35 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence
for expandido = tiempo método

método				
tiempo		conv	vitridos	
24	Observed	84	88	172
	Expected	91.12	80.88	
	Cell Chi-Sq	0.56	0.63	
48	Observed	60	52	112
	Expected	59.34	52.66	
	Cell Chi-Sq	0.01	0.01	
72	Observed	25	10	35
	Expected	18.54	16.46	
	Cell Chi-Sq	2.25	2.53	
		169	150	319

Overall Chi-Square 5.98
P-Value 0.0502
Degrees of Freedom 2

Cases Included 39 Missing Cases 0

Statistix 8.0
07:49:33 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence
for eclosiona = tiempo método

método				
tiempo		conv	vitridos	
24	Observed	24	37	61
	Expected	25.79	35.21	
	Cell Chi-Sq	0.12	0.09	
48	Observed	35	42	77
	Expected	32.56	44.44	
	Cell Chi-Sq	0.18	0.13	
72	Observed	4	7	11
	Expected	4.65	6.35	
	Cell Chi-Sq	0.09	0.07	
		63	86	149

Overall Chi-Square 0.69
P-Value 0.7078
Degrees of Freedom 2

Cases Included 39 Missing Cases 0

Statistix 8.0
08:01:08 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence
for expandido = tiempo método

método				
tiempovitridos		vitriuno		
24	Observed	88	114	202
	Expected	85.11	116.89	
	Cell Chi-Sq	0.10	0.07	
48	Observed	52	52	104
	Expected	43.82	60.18	
	Cell Chi-Sq	1.53	1.11	
72	Observed	10	40	50
	Expected	21.07	28.93	
	Cell Chi-Sq	5.81	4.23	
		150	206	356

Overall Chi-Square 12.86
P-Value 0.0016
Degrees of Freedom 2

Cases Included 42 Missing Cases 0

Statistix 8.0
08:02:23 p.m.

13/11/2012,

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence
for eclosiona = tiempo método

método		tiempovitridos		vitriuno		
24	Observed	37	62			99
	Expected	50.68	48.32			
	Cell Chi-Sq	3.69	3.87			
48	Observed	42	12			54
	Expected	27.64	26.36			
	Cell Chi-Sq	7.46	7.82			
72	Observed	7	8			15
	Expected	7.68	7.32			
	Cell Chi-Sq	0.06	0.06			
		86	82			168

Overall Chi-Square 22.96
P-Value 0.0000
Degrees of Freedom 2

Cases Included 42 Missing Cases 0

Anexo B. Protocolo Comercial de Vitrificación Achilles Genetics – Vitrogen



PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO **VITROGEN & ACHILLES GENETICS**

Preparación del material para el procedimiento

- Preparación del bloque de vitrificación (esterilizar en autoclave);
- Preparación de pipetas calibradas a 5 y 1,5 mL
- Pipeta para transferir el embrión de una gota (1,5 mL)
- Identificación de los embriones en el acristalamiento de barra (dos embriones / barra)
- Identificación de canecas o botellas de nitrógeno.
- El calentamiento de los medios de la vitrificación en el tablero (no superior a 27 °C) y volver a la nevera (Tenga cuidado, porque el medio ambiente se degrada por encima de 32 °C);
- Montaje de la placa de la vitrificación.

Evaluación de embriones

Para el procedimiento sólo se utilizan embriones clasificados como grado I y el estadio mórulas, blastocisto y blastocisto expandido.

Montaje de la placa de vitrificación.

Poner la placa de montaje significa la mitad del balance – consta de un medio de equilibrio (ME), un medio de vitrificación 1 (Vit1) y medio vitrificación 2 (Vit 2) para calentar a una temperatura de 27 °C. Utilizando la pipeta calibrada 5µL para cada gota y hacer una placa nueva a cada embrión.



Procedimiento de Vitrificación.

Retirarlos embriones de la incubadora y llevarlos a un medio de cultivo in vitro (CIV) (eliminar el exceso de aceite-cambio de puntas de pipeta), lavar los embriones en 3 gotas por cada 2 minutos en total. Después de este procedimiento puesto el embrión en la primera gota de medio Vit1, pasa a través de tres caídas, la lectura se da en un total de 2 minutos en 3 gotas. Después se hace la transferencia del embrión al medio Vit2, revolviendo y lavando los embriones en cada gota, y en la tercera gota habrá tiempo suficiente para depositar el embrión en el gancho de vitrificación con la micropipeta para que sea cristalizado. Con un volumen de 1,5 mL y luego apoyado en el bloque de vitrificación, ya montado, que no exceda

de 45 segundos desde el principio del tiempo en el medio Vit2, vidrios gancho de seguridad en su apoyo, señalando que el acristalamiento del gancho debe estar a temperatura ambiente y cubrirla (punta de la cuchilla de acero inoxidable) ha puesto acristalamiento en el bloquea ser frío. La colocación del embrión en el gancho debe hacer fuera del estereoscopio, después de la vitrificación es necesario verificar si el embrión está en la punta de la micropipeta. Seguido de la vitrificación los embriones deben ser colocados en los bastidores de nitrógeno líquido criogénico previamente identificados.

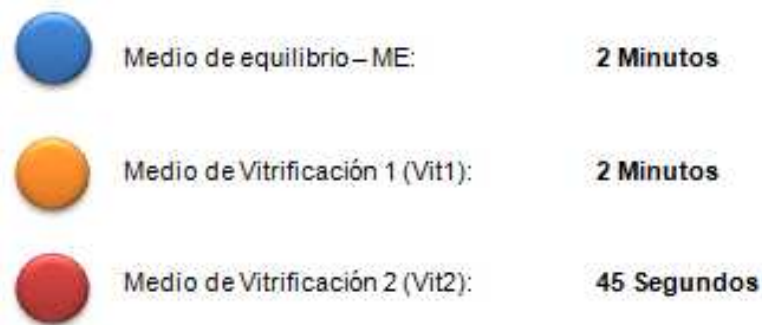
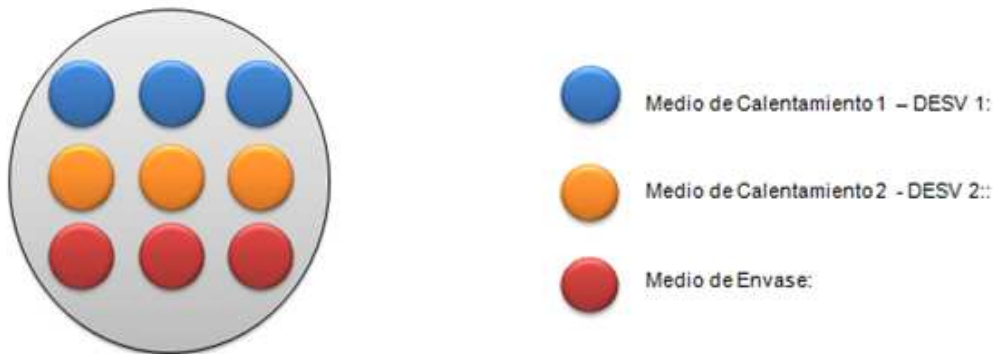


Figura 2. Protocolo de vitrificación. Fuente Vitrogen, (2011)

Protocolo de Calentamiento.

Montaje de la placa para el Calentamiento.

Para montaje de la placa, utilizar pipeta calibrada de 5 μ L para hacer gotas como en la siguiente figura:



Procedimiento de Calentamiento

Extraer el embrión que es calentado del termo de nitrógeno, quitar el gancho de la hoja y dejar que el embrión caiga en la primera gota 7 segundos, así que no hay peligro de perder el embrión, después de un tiempo determinado, sumergir el gancho en la primera gota de medio DESV 1 a través de un pase del embrión a través de la primera caída hasta la tercera DESV 1, un total de 2 minutos, repita el mismo procedimiento con la segunda mitad DESV 2, después de este procedimiento de lavado el embrión pasen al medio de envase para transferencia.

